

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ QUỐC GIA
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐỀ TÀI NCKH CẤP NHÀ NƯỚC
NGHIÊN CỨU CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ
PHỤC VỤ CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG
(thuộc Chương trình KC 04, mã số KC 04.08)

ĐỀ TÀI NHÁNH
**NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO
VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ
CHỌN TẠO GIỐNG CÂY TRỒNG**

CNĐT: NGUYỄN THỊ LẠNG

Hà Nội - 2005

Đề tài nhánh

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ KỸ THUẬT CHỈ THỊ PHÂN TỬ PHỤC VỤ CHỌN GIỐNG CÂY TRỒNG

Nguyễn thị Lang , Đặng Minh Tâm , Bùi Chí Bửu và Lê thị Mụi

I. MỞ ĐẦU

Những tiến bộ kỹ thuật về chuyển nạp gen, ứng dụng marker phân tử trong chọn lọc giống lúa (MAS) đã tạo điều kiện vô cùng thuận lợi cho nhà chọn giống trong quá trình hoàn thiện mục tiêu lai tạo. MAS đã thực sự trở thành công cụ đắc lực cho nhà chọn giống trong việc cải tiến những tính trạng do đơn gen điều khiển. Những tính trạng do đa gen điều khiển như năng suất, tính chống chịu khô hạn, mặn, độ độc nhôm, sắt, chống chịu thiếu lân cần có nhiều thời gian hơn để có kết quả mong muốn

Việc kết hợp phương pháp chọn giống truyền thống với phương pháp sử dụng dấu chuẩn phân tử là một xu hướng mới. Năm 1998, IRRI đã đề xuất một chương trình lai backcross cải tiến nhằm khai thác nguồn gen đa dạng của nhiều quốc gia trong mạng lưới hợp tác. Bên cạnh đó, các nghiên cứu cơ bản về marker có tính khả thi trong ứng dụng MAS vào cải tiến giống lúa theo phương pháp lai truyền thống, trên cơ sở bản đồ các loci số lượng (QTLs)

Mục tiêu của đề tài:

Ứng dụng công nghệ sinh học.(công nghệ tế bào và phân tử) chọn giống lúa có phẩm chất

II.Sự tổng quan nghiên cứu

II. 1. Sự biến dị tế bào soma và giao tử

Khi cây tái sinh từ tế bào nuôi cấy mô , cây này sẽ có các tính trạng di truyền gần như hoàn hảo và được chứng minh từ nguồn cây ban đầu trước khi cấy . Các cây này dựa vào quá trình gián phân mà do phát triển phát triển nhân lên của tế bào. Nếu xét về gốc độ di truyền thì các cây tái sinh ban đầu không thật sự đồng đều và người ta đặt cho chúng một cái tên là biến dị tế bào soma (somaclonal variation) . Và nhờ biến dị trong nhân bản của soma mà có thể cung cấp nhiều giá trị cho việc cải tiến cây trồng , đồng thời nguồn gen mới bổ sung trong ngân hàng gen phục vụ cho công tác chọn tạo giống.

Một số nhà nghiên cứu cho rằng sự thay đổi của kích thước cây, hoa, lá , thành phần tinh dầu, ... sự thay đổi tùy theo tuổi của các callus và của từng giống cây . Một số tác giả người Pháp nghiên cứu cho nghiên cứu sự biến đổi hình thái bên ngoài của cây là một hiện tượng mà hiện tượng này do đột biến mà ra . Thí dụ vài đột biến có thể xảy ra các thể hệ tiếp theo xem như là gen lặn (recessive) như diệp lục . Đối với gen trội (dominat) như thân cây vv... Sibi (1976) cho rằng hiện tượng thì sẽ không phân ly

trên 4 thế hệ . Các kết quả này được kiểm chứng khi phân tích tế bào chất . Thông qua nghiên cứu tế bào chất và trở lại bình thường qua 4 thế hệ .

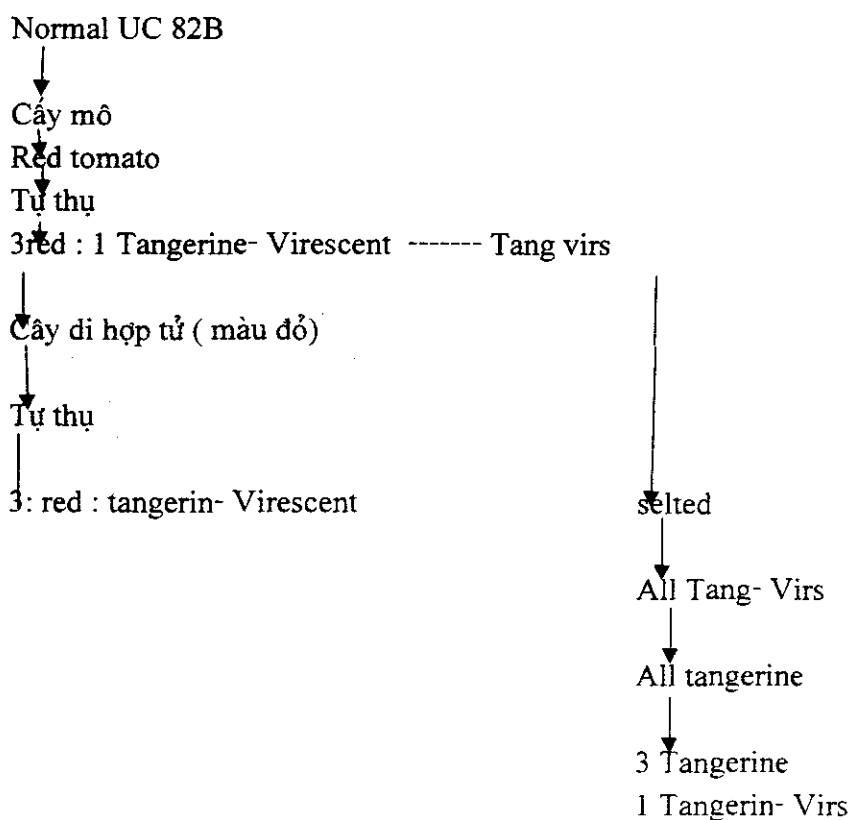
II.1.1. Hiểu biết biến dị của tế bào soma

Somaclonal và gameclonal biến động tùy thuộc vào sự di truyền trong quá trình từ tế bào nuôi cấy mô theo định luật của Medelian hoặc không Mendian(định luật phân ly) . Biến động di truyền của cây xảy ra nguyên nhân là kết quả biến động của các mô , kể cả quá trình tế bào được nuôi cấy mô . Các yếu tố là thay đổi thường thấy

- Môi trường nuôi cấy mô
- Cây tái sinh trồng trong nhà lưới với sự phát triển bình thường cây ra hoa và lá . Cây này người ta gọi là cây R 0 và cây R0 sẽ được tự thụ thành cây R 1 . Hạt của cây R1 được thu hoạch và trồng ngoài đồng để đánh giá .

Các nhà chọn giống và nhà công nghệ sinh học đã có ý kiến trong việc cải tiến cây trồng nhờ vào gen pools , mà theo như tham khảo tế bào trần và tái tổ hợp DNA sẽ tạo nhiều triển vọng trong việc cải tiến giống lúa . Sự biến đổi của tế bào soma sẽ làm rút ngắn trong quá trình chọn giống . Nhiều báo cáo cho thấy kết quả khi nuôi cấy tế bào soma cho nhiều dòng mới và những phương pháp được phát triển cho tới nay .

Sau đây là một thí dụ cách dùng để phân tích di truyền cho biến động somaclonal trên cây cà chua



Biến đổi di truyền trong sonaclonal, trên cây R 0 hoặc R 1 : thường thay đổi thể hiện trên nhiễm sắc thể, cấu trúc của nhiễm sắc thể, đột biến trong nhân, và thay đổi DNA trong tế bào chất. Sự thay đổi nhiễm sắc thể thường là phần chung liên quan với giảm sự bất thụ và tỉ lệ trong di truyền tự thụ trong cây. Nói chung tùy theo giống mà sự thay đổi này có khi thay đổi các tính trạng trong cây trồng.

Ngược lại nhiều gen lặn đột biến nếu :

(i) thứ nhất : biến động trong R 0 không xuất hiện

(ii) thứ hai: cây R1 tự thụ theo tỉ lệ 3: 1 theo định luật Mendel. Để xác định tính trạng như mong muốn là một tính trạng đơn gen, thế hệ phải hoàn toàn là đơn gen cây tiếp tục phân ly theo tỉ lệ 3:1 và chuyển sang quần thể R2.

Một trường hợp của đơn gen trong nhân, sự thay đổi di truyền trong tế bào chất cũng do nguyên nhân gây ra do biến động của clone soma. Nhiều chi tiết đã đánh giá có thể biến động trên di truyền tế bào chất bởi GengenBack và đồng nghiệp của ông trên hai tính trạng bất dục đực. Một mẫu cảm với toxin của *Drechslera maydis* mang nòi T nguyên nhân làm bạc lá trên bắp, nòi này quan hệ rất chặt chẽ có chứa gen bất dục đực (cms-T). Trong hạt của cây bắp mang hai gen này.

Tuy nhiên cũng tùy trường hợp mà cơ chế di truyền trong cây soma có khác nhau nhiều và rất phong phú trong biến động.

II.1.2. Biến dị trong giao tử

Biến đổi cơ bản di truyền trong giao tử tùy thuộc vào vật liệu mà nuôi cấy. Thí dụ catomat dùng diploid do đó thế hệ di hợp tử tách ra các dòng mới đột biến trong thế hệ R 1. Nhờ thay đổi rất mạnh nên nhà chọn giống lợi dụng kỹ thuật này để cải tiến giống. Chú ý quan trọng là tế bào soma sẽ cho ra các somaclones và các game sẽ cho ra các gameclones. Các gametes sản xuất trong giai đoạn giảm nhiễm do định luật Mendel đã chứng minh và định luật độc lập trong phân ly. Ba điểm khác trong di truyền mà cả soma và gametes được chia ra :

- Đột biến cả tính trội và lặn
- Tái tổ hợp của gametoclone là kết quả của giảm nhiễm chứ không phải gián phân,

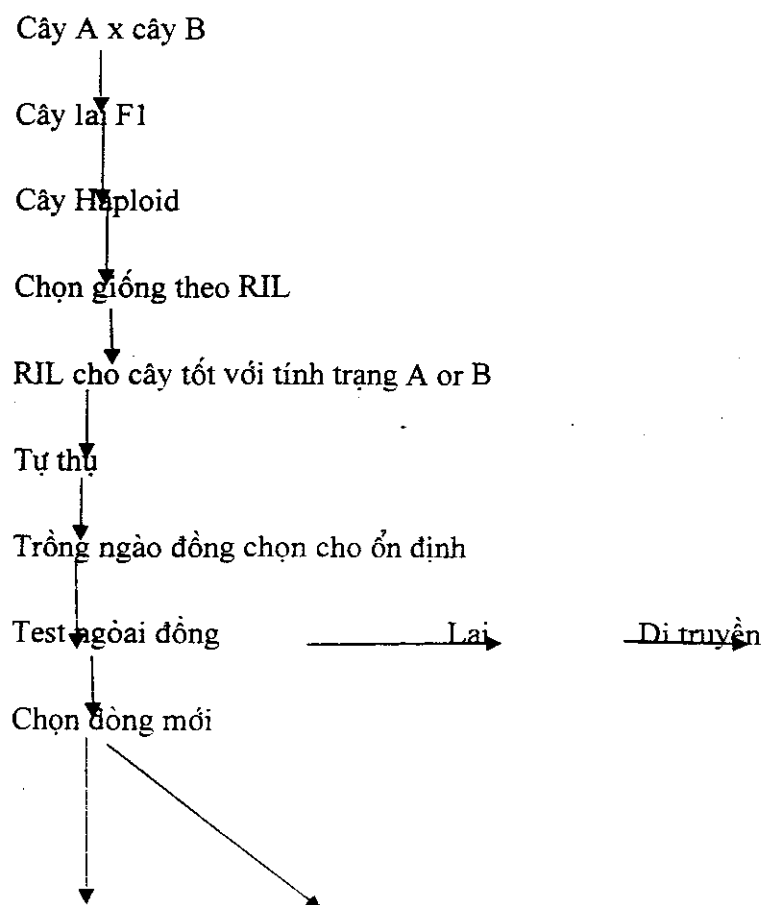
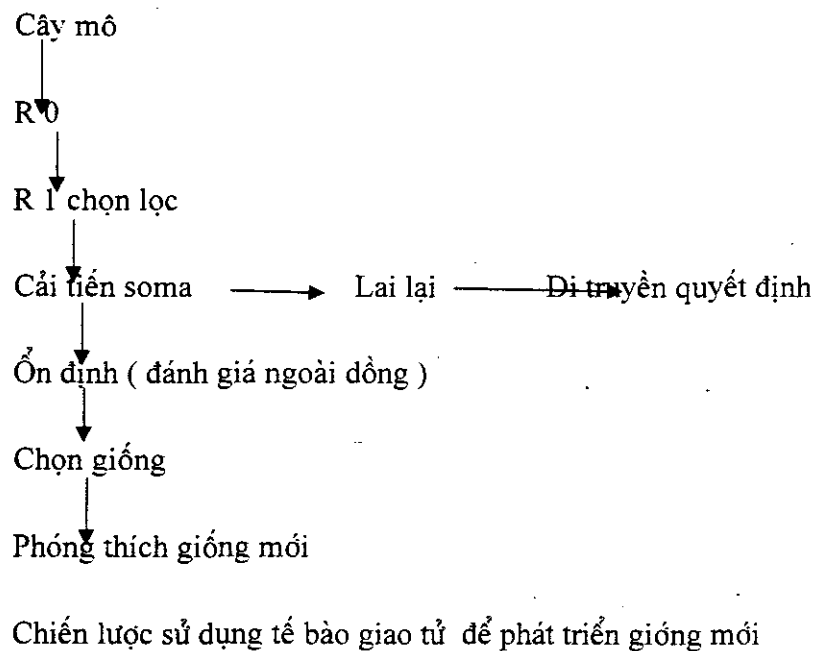
II.1.3 Chiến lược trong chọn giống

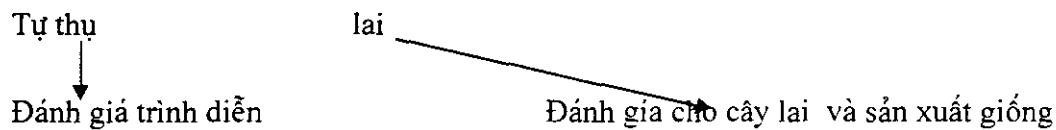
Chiến lược chọn giống dựa vào kết quả của quá trình thay đổi của tế bào soma và giao tử. Cách làm này cũng được so sánh với phương pháp chọn giống theo cổ truyền và đột biến sau

Sau đây là chiến lược dùng biến động của soma để phát triển cây mới

Giống tốt







II.2 .Tạo tế bào Haploid

Haploids là sporophytes của thực vật bậc cao với nhiễm sắc thể bằng với số giao tử . A.D Bergner đã khám phá tế bào haploid trong *Datura stramonium* vào năm 1921, khi mà các nhà chọn giống trồng cây trong invitro. Kỹ thuật trong invitro đã sử dụng hai yếu tố di truyền là gynogenesis , androgenesis, thông qua lai , nghiệm thức hóa học , nhiệt độ và ảnh hưởng của phóng xạ. Bước đầu năng suất thu hoạch cây có tế bào haploid rất thấp . Sau đó người ta dùng nuôi cấy túi phấn thu hoạch thành công tạo tế bào haploid cao hơn .

Kỹ thuật thành công tạo tế bào haploid trên *Datura innoxia* được nhóm nhà khoa học gia Ấn độ công bố . Tiếp theo đó thành công trên cây thuốc lá, cà chua , lúa bắp vv..

Các thành công này nhờ các yếu tố sau

- Sức khỏe của cây
- Kiến thức về túi phấn
- Nghiệm thử nhiệt độ

II.2.1.Làm thế nào để phát triển cây đơn bội (haploid)

Cây có tế bào haploid là cây mà nhiễm sắc thể của nó bằng với số nhiễm sắc thể của giao tử đực hoặc giao tử cái . Cây đơn bội thường xuất hiện thấp trong tự nhiên (10 - 4 , 10 -5) . Hình thái cây đơn bội có đặc điểm như lá nhỏ, cây thấp vv... so với cây nhị bội (diphaloid) .

Để tạo cây đơn bội người ta dùng túi phấn , những cây đơn bội sẽ cho mô sẹo thay đổi từ 30 đến 60 % .

Tuy nhiên khi nghiên cứu và quan sát trên cây tái sinh trên một số loài có cả cây nhị bội và đa bội , nguyên nhân do quá trình đột biến . Nguyên nhân có thể do tăng thời gian nuôi cấy kéo dài, nhiệt độ cao sau khi cấy chuyển . Đôi khi túi phấn cũng bị ảnh hưởng do làm tăng sự nhân đôi của nhiễm sắc thể .

+Các yếu tố ảnh hưởng haploid

Một số yếu tố di truyền (androgenesis) trong vitro. Kiểu gen của cây có vai trò và ý nghĩa rất quan trọng trong sản xuất và tần số của hạt phấn . Túi phấn là yếu tố cũng giúp phôi phát triển . Tạo một hạt phấn từ vào phôi xảy ra cần có túi phấn . Túi phấn là bức tường cung cấp cho mầm non phát triển. Có hai nhóm đánh giá vai trò của túi phấn : Một là có thể phát triển đồng thời của phôi hạt phấn(Có thể do do sự hện diện thúc đẩy của vài amino acid như glutamine và serine) . Một quan niệm khác có thể là môi trường thúc đẩy hạt phấn thành phôi.

Môi trường cấy phải thay đổi phù hợp yếu tố di truyền theo từng lứa tuổi của túi phấn để cho cây phát triển. Môi trường đầy đủ các thành phần vô cơ và dinh dưỡng theo yêu cầu sinh lý của cây. Thêm vào các nguyên nhân cơ bản như muối, và vitamin, hormone cho tạo thành phôi và mô sẹo. Cytokinins (kinetin) là tối cần thiết để tạo mô từ hạt phấn trên nhiều cây ngoại trừ thuốc lá. Auxin, 2,4-D gia tăng phôi trên các loài ngũ cốc. Đối với cây tái sinh cytokinin và nồng độ auxin thấp là thường cần thiết.

Glucose có thể dùng nuôi cấy túi phấn trong vài trường hợp, nhưng fructose thì kém hiệu quả. Nồng độ sucrose cũng quan trọng vai trò tạo cây từ hạt phấn. Hoạt động của than hoạt tính cũng thêm vào môi trường cấy giúp di chuyển hoặc loại bỏ agar. Một vai trò khác của than hoạt tính hấp thu 5-hydroxymethylfurfural, một sản phẩm của sucrose dehydration trong thời gian thanh trùng.

Một vài nguyên tố hữu cơ để thúc đẩy quá trình phát triển của cây. Một vài protein như casein (tìm thấy trong sữa) acid nucleic, vv. Nước cốt dừa thường cũng được thêm vào trong môi trường nuôi cấy. Chúng chứa đường, kích thích sinh trưởng và vài vitamin.

Kiến thức về sinh lý cây trồng sẽ giúp tốt hơn trong sản xuất cây haploid: Nhiệt độ các giai đoạn phát triển của hạt phấn.

+ Sự phát triển của Androgenic Haploid

Trong điều kiện bình thường hạt phấn trưởng thành nhưng trong môi trường cấy lệ thuộc vào môi trường, sự phát triển có thể dẫn đến thành phôi và cây hoặc một khối mô sẹo khổng lồ. Bốn hướng cơ bản của sự phân chia bào tử xem như là tạo androgenetic trong ống nghiệm.

II.2.2. Các giai đoạn phát triển bình thường và phát triển phôi của hạt phấn

Hạt phấn chứa tứ tử và bình thường hạt phấn được phóng ra. Túi phấn, tế bào mẹ mang $2n$ phân chia thành 4 tế bào con, giai đoạn này được gọi là đơn nhân. Sau quá trình nhân đôi tế bào chia ra làm hai, một mang một nhân dinh dưỡng và một mang một nhân sinh dục. Nhân sinh dục lại chia đôi và hai nhân này sẽ làm nhiệm vụ thụ tinh kép cho noãn và nội nhũ của túi phấn cho thấy giảm phân trên thực vật bậc cao. Túi phấn và bầu nhụy trên cùng một hoa. Túi phấn, tế bào mẹ mang $2n$ phân chia thành 4 tế bào con.

Bước phát triển đầu tiên của hạt phấn vẫn xảy ra bình thường cho tới giai đoạn 2 nhân. Quá trình tạo phôi thường bắt đầu từ nhân sinh dục, nhân dinh dưỡng hai cả hai nhân.

Tuy nhiên nhân dinh dưỡng thường tạo phôi bền lâu và đóng vai trò chính , còn nhân sinh dục chỉ phân chia một lần rồi ngưng. Một số loài ngoại lệ cây đơn bội phát triển từ nhân sinh dục nhưng thường rất yếu. Một số kết quả tiếp theo cho rằng nuôi cấy có nguồn gốc nhân đôi của nhân sinh dục .

Nhìn chung với kỹ thuật nuôi cấy trong ống nghiệm cho phép chúng ta tạo cây đơn bội bằng nhiều con đường khác nhau , nhưng con đường bắt đầu từ tiểu bào tử vẫn tiện và dễ hơn, thành công tốt hơn .

II.2.3. Làm thế nào nhận biết các giai đoạn phát triển của tiểu bào tử

Một vài chỉ thị để nhận biết các giai đoạn phát triển trên cây hai lá mầm . Thí dụ như cây thuốc lá , nhận biết thông qua , chiều dài nụ, chiều dài lávv,. Tuy nhiên đối với cây một lá mầm , mức độ phát triển của bao phấn rất phụ thuộc vào vị trí hoa trên bông. Sự tương quan rất chặt với hình dạng đòng và hao. Do đó khi nuôi cấy túi phấn cần chú ý đến giai đoạn phát triển đòng

Chọn những đòng cây lúa c1 khoảng cách giữa tai lá đòng và lá thứ hai chừng 3-5cm, tương ứng với giai đoạn phát triển của túi phấn thích hợp cho việc nuôi cấy . Khi bóc vỏ lá đòng sẽ thấy đầu vỏ hạt lúa có màu xanh lá mạ nhạt , các hạt phấn bên trong có màu vàng nhạt và cao khoảng một phần ba (1/3 chiều dài của hạt lúa.

II.2.4. Các biến dị trong nuôi cấy túi phấn thường gặp

Cây mô lúa nhằm mục đích là sản xuất cây đơn bội hoặc cây lưỡng bội đòng hợp tử qua sự nhân đôi nhiễm sắc thể ở mô sẹo đơn bội từ cây túi phấn. Các biến dị thường gặp và được biết thông qua biến dị mô hay biến dị tế bào soma (somaclonal variation) .

+Biến dị không bình thường

Do biến dị này cây phát triển không bình thường như bạch tạng, cây méo mó, lùn vv... . Do đó gia tăng biến dị của giống cây trồng cũng là một phần quan trọng trong công tác cải tiến cây lúa . Để tăng tần suất biến dị có hiệu quả thường kết hợp cả hai phương pháp nuôi cấy mô và phương pháp gây đột biến bằng hóa chất hoặc tia phóng xạ (phần II)

II.2.5. Nguyên nhân tạo cây bạch tạng

Cấu trúc tế bào của lá cây bạch tạng cho thấy không có ribosome. Do đó quá trình sinh tổng hợp protein của cây bạch tạng không hoàn toàn dẫn đến tình trạng không màu trên cây và lá và không thành lập các tiền lục lạp .

Khi nuôi cấy cây hai lá mầm , chuyển trực tiếp từ tiểu bào tử nên ít thấy xuất hiện cây bạch tạng . Đối với cây một lá mầm như lúa , cây hoàn chỉnh và phát triển phải qua giai đoạn mô sẹo thì tỉ lệ bạch tạng chiếm tỉ lệ khá cao , tỉ lệ này có khi lên đến 50- 80% . Điều này dẫn đến cây tái sinh rất thấp . Một số nguyên nhân dẫn đến cây bạch tạng như sau :

- Tuỳ theo giống : tần số bạch tạng thay đổi tuỳ thuộc vào giống có giống ít có giống nhiều
- Nhiệt độ nuôi cấy : Nhiệt độ càng cao thì tỉ lệ cây bạch tạng càng cao

- Tuổi mô sẹo cây chuyển sang môi trường cây tái sinh. Nếu dùng mô sẹo già cây nhiều lần thường cho tỉ lệ tái sinh thấp, mất khả năng tái sinh. Có tỉ lệ bạch tạng tăng
- Tăng lượng 2,4-D cũng là nguyên nhân gây cây bạch tạng.

Môi trường tái sinh cho cây nuôi cấy túi phần

Cây con có thể tạo trực tiếp từ phôi đơn tính đực mà không cấy chuyển. Trường hợp các phôi cần phải cấy chuyển sang môi trường mới gọi là môi trường tái sinh. Mỗi loại cây sẽ có môi trường tái sinh khác nhau. Thí dụ cây lúa môi trường tái sinh cần lượng đường thấp 20- 30 gram/ lit và 2,4-D được thay bằng NAA, hoặc IBA. Môi trường cơ bản vẫn MS với 4mg/lit kinetin và 0,5 mg/lit IAA. Tuy nhiên cũng cho tỉ lệ bạch tạng khá cao. Chú ý tuổi của mô sẹo có ảnh hưởng đến tần suất của cây tái sinh.

II.3. Chỉ thị phân tử

DNA marker là những marker phân tử được tạo ra nhờ kỹ thuật phân cắt DNA bằng những "restriction endonuclease" (enzyme nội sinh, phân cắt hạn chế). Khi sáng tạo ra những đoạn DNA mới, người ta đã cố gắng tìm kiếm một sự liên kết giữa marker và gen định vị trên nhiễm sắc thể nào đó. Điều này hoàn toàn có thể thực hiện được nhờ công trình có tính lịch sử của Morgan về liên kết gen và khoảng cách di truyền (tính bằng centi Morgan, viết tắt là cM). Bản đồ di truyền đơn giản của ruồi giấm đã được phát hiện rất sớm vào năm 1925. Những tính trạng có biểu hiện giống nhau về di truyền được xếp vào cùng một nhóm liên kết gen, trên cùng một nhiễm sắc thể. Những tính trạng này được xác định trên nhiễm sắc thể tùy thuộc mức độ liên kết của nó. Sự sắp xếp một cách độc lập các nhiễm sắc thể giúp cho việc định vị của loci trong các nhóm liên kết gen. Sự xuất hiện của hiện tượng quần chéo (crossing over) trong gián phân giảm nhiễm giúp cho việc xác định thứ tự của các loci trong nhiễm sắc thể. Khoảng cách di truyền trên bản đồ được đo bằng tần suất tái tổ hợp gen (recombination). Gen thể hiện bản chất di truyền sẽ được liên kết với một tính trạng hình thái nào đó mà người ta có thể đo đếm được - gen đó có thể xem như là marker gen. Thí dụ liên kết gen giữa lá mầm có màu tím và tính kháng rầy nâu của một vài giống lúa ở Đông bắc Ấn Độ. Khi giống kháng có lá mầm màu tím được lai với giống nhiễm có lá mầm màu xanh, sẽ có 90% cơ hội để con lai F₂ có màu tím, thể hiện tính kháng rầy nâu. Như vậy lá mầm màu tím được xem như marker đối với tính kháng rầy nâu.

Việc lập bản đồ gen và chọn lọc nhờ marker hình thái như vậy sẽ rất chậm. Số marker quá ít và chỉ có ở qui mô hình thái (cơ quan).

Việc áp dụng isozyme marker đã làm thay đổi theo chiều hướng tốt hơn, nhưng số marker cũng quá ít, không thoả mãn cho nhu cầu nghiên cứu.

DNA marker đã được chứng minh có tầm quan trọng hơn về lâu dài, do số lượng của nó lớn hơn rất nhiều lần "isozyme marker" (Tanksley và ctv. 1980). Việc áp dụng DNA marker dễ dàng hơn và tương lai sẽ rộng rãi hơn nhờ sự cải tiến kỹ thuật ngừng của các nhà khoa học.

Về căn bản, bất cứ chuỗi mề DNA nào được dùng để phân biệt giữa hai cá thể, hai dòng hoặc giống khác nhau, đều có thể được xem như là một DNA marker. Các DNA markers có thể được chia thành hai nhóm như sau:

DNA marker đã được chứng minh có tầm quan trọng hơn về lâu dài, do số lượng của nó lớn hơn rất nhiều lần “isozyme marker” (Tanksley và ctv. 1980). Việc áp dụng DNA marker dễ dàng hơn và tương lai sẽ rõ ràng hơn nhờ sự cải tiến không ngừng của các nhà khoa học.

Về căn bản, bất cứ chuỗi mã DNA nào được dùng để phân biệt giữa hai cá thể, hai dòng hoặc giống khác nhau, đều có thể được xem như là một DNA marker. Các DNA markers có thể được chia thành hai nhóm như sau:

- PCR-based: ALP, AFLP, SSR, SSCP
- DNA / DNA hybridization-based: RFLP, minisatellite

Các markers thuộc nhóm PCR-based có thể được chia nhỏ thành:

MAAP

marker ngắn, có tính ngẫu nhiên: RAPD, AP-PCR
DAF, AFLP

và amplicon đơn: ALP, SSR, SSCP

Những lợi ích của DNA markers so với marker hình thái và isozyme marker là

- đo lường trực tiếp các vật liệu di truyền
- có nhiều markers trong quần thể
- đo lường không chỉ phối ảnh hưởng môi trường và ảnh hưởng có tính chất phát triển

Các loại DNA markers thông dụng

Marker	Tên đầy đủ
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ALP	Amplicon length polymorphism
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
DAF	DNA amplification fingerprinting
SSR	Simple sequence repeat (microsatellite)
AP-PCR	Arbitrary primer-PCR
SSCP	Single strand conformation polymorphism
MRDHV-DNA	Moderately repeated, dispersed, and highly variable DNA (minisatellite)
SNP	Single nucleotide polymorphism

II.3.1 . RFLP MARKER

Trong các DNA markers, RFLP (restriction fragment length polymorphism) là marker được dùng phổ biến nhất và được biết nhiều nhất. Trong nhiều trường hợp, thuật ngữ RFLP marker đồng nghĩa với DNA marker. Có nhiều giai đoạn để tạo ra chất thăm dò RFLP marker và tạo ra thể đa hình DNA.

. Phân lập DNA

Trước hết chúng ta phải chuẩn bị chất thăm dò của marker và bộ lọc DNA lai. Đó là giai đoạn có tính chất quyết định trong phân tích RFLP. Thí dụ chúng ta cần có DNA từ mô lúa với số lượng nhiều và chất lượng tốt. Trong quá trình phân lập DNA, người ta phải lấy mô lúa từ trong nhà kính hoặc trên đồng ruộng, mô này được nghiền bằng cối trong nitrogen lỏng. Bởi vì thành tế bào cây lúa rất cứng và rất khó phá vỡ. Nitrogen lỏng làm cho các mô trở nên lạnh và dẻo, như vậy mô có thể được nghiền mịn. Chất đệm khi ly trích DNA có chứa SDS, chất này có thể phân giải màng tế bào và màng nhân, phóng thích DNA vào dung dịch. SDS là chất tẩy khá mạnh, nó có thể làm biến đổi protein ở nhiệt độ 65°C. Sự biến đổi này làm cho các DNA gắn với protein bị tách rời ra khỏi DNA cần nghiên cứu. Protein và chất cặn của tế bào được tách rời ra khỏi DNA bằng phenol / chloroform hay bằng phương pháp kết tủa chọn lọc của những chất cặn tế bào với potassium acetate. DNA ở pha lỏng sẽ được kết tủa bằng cách thêm vào isopropanol.

Phân lập DNA bằng phương pháp nói trên chỉ áp dụng với DNA có kích thước lớn hơn 30 kb có một ít tạp chất như polysaccharide. Số lượng nhỏ của tạp chất như vậy có thể chưa gây ra vấn đề gì khi phân tích Southern. Nhưng chúng sẽ gây khó khăn khi chạy điện di trên gel, do đó chúng ta phải hết sức thận trọng trong lúc phân lập DNA.

Nguồn gốc của mô cũng ảnh hưởng đến số lượng và chất lượng DNA. Mô của cây khỏe và trẻ cho kết quả phân lập DNA tốt nhất. DNA được phân lập trên mô già hoặc trên loài lúa hoang thường bị tạp do polysaccharide và cho kết quả rất thấp.

DNA được phân lập có thể tồn trữ trong điều kiện -20°C. Nhưng chúng ta phải lưu ý rằng, một chút thay đổi nhỏ nào trong quá trình đông lạnh cũng có thể làm phân hủy DNA, tránh đông lạnh nhiều lần, hoặc làm tan băng nhiều lần DNA.

Trong quá trình phân lập, người ta phải sử dụng nhiều dung môi. Có hai dung môi hết sức quan trọng đó là EDTA và Tris.

Tris (Trisma, base) đã được sử dụng với khả năng đệm rất có hiệu quả trong dung môi. Ở pH 8.0, DNA rất ổn định. Trong điều kiện môi trường acid, purine rất dễ bị loại thải, tiến trình này được gọi là “depurination” (phản purine hóa). Cầu nối phosphodiester dễ bị phá vỡ, tạo ra kết quả phản purine hóa. Tuy nhiên tính chất này vẫn được sử dụng trong Southern blotting. Do đó, người ta phải kiểm soát pH của dung môi ở mức 8.0 khi dùng Tris.

DNA có thể bị hỏng bởi các enzyme làm cho các mẫu DNA bị tạp. Chỉ cần chất gây tạp ở thể vệt cũng đủ để gây cho DNA bị hỏng. Enzyme này có thể truyền từ tay của người làm thí nghiệm, hoặc từ không khí, do vậy chúng ta phải rất thận trọng. Để ngăn ngừa khả năng DNA bị thủy phân bởi enzyme, người ta phải sử dụng thêm EDTA. Tất cả các enzyme thủy phân DNA được biết hiện nay đều cần Mg^{++} làm cofactor. EDTA có thể kềm giữ Mg^{++} và làm bất hoạt nó trong dung môi. Không có Mg^{++} , enzyme không thể hoạt động.

2. Sự phân cắt DNA

Có một nhóm enzyme thủy phân DNA được ghi nhận chuyên tính đối với một chuỗi mã DNA nào đó. Nhóm enzyme này được gọi với thuật ngữ là “restriction endonuclease” (enzyme nội sinh, phân cắt hạn chế). Tiến trình thủy phân DNA bằng restriction endonuclease được gọi với thuật ngữ “restriction digestion” [sự tiêu hoá tại điểm xung yếu, có tính chất hạn chế]. Để hiểu rõ tại sao người ta phải dùng từ

“restriction” trong trường hợp này, chúng ta hãy xem lại khái niệm có tính chất giáo trình về “di truyền thể phage “. Người ta đã tìm ra rất nhiều restriction endonuclease, với hơn 100 enzyme có giá trị kinh tế, mỗi enzyme này có tác dụng chuyên tính với một chuỗi mã di truyền nào đó. Trong hầu hết các trường hợp, đoạn mã di truyền này có tính chất tự tái bản, được cắt theo dạng “palindromic “ (5’-3’). Thí dụ, endonuclease *EcoRI* chỉ phản ứng trên chuỗi DNA tại G / AATTC. Theo tính chất của cấu trúc palindromic tại vị trí mục tiêu để phân cắt, người ta có thể viết một nửa chuỗi mã di truyền DNA, nếu một nửa trước đó, kể từ vị trí cắt đã được biết rồi.

Nhiều đoạn mã được ghi nhận gồm có 6 cặp base [bp] của DNA. Trong một đoạn mã ngẫu nhiên nào đó, tần suất của vị trí này sẽ là 4096 bp (4^6). Nhóm enzyme ghi nhận 6 bp DNA được gọi là “6 bp cutter” trong phòng thí nghiệm. Nhóm enzyme khác ghi nhận 4 bp DNA, thí dụ như *Alu I* sẽ tiêu hoá chuỗi DNA có mang mã AGCT, được gọi là “4 bp cutter”

DNA sẽ được đưa vào một bộ sưu tập DNA thống nhất sau khi hoàn tất việc phân cắt các chuỗi mã thành những đoạn phân tử riêng biệt.

Tất cả những đoạn phân tử này sẽ có những phần cuối rất đặc biệt. Các đoạn phân tử sau khi được tiêu hoá bằng *Eco I*, mang vị trí 5’ ở điểm cuối - còn gọi là “sticky end”. Các sticky end (đầu dính) này có thể tác động qua lại với nhau. Nếu điều kiện cho phép, thí dụ như sự có mặt của ligase và ATP, những đầu dính kết hợp với nhau theo dạng đồng hoá trị, trước khi tiêu hoá.

. Điện di trên gel

Độ lớn của các đoạn phân tử sau khi tiêu hoá biến thiên trong khoảng 30 kb, có khi nhỏ hơn 100 bp. Để xác định các đoạn phân tử DNA thông qua kỹ thuật phân tích Southern, người ta điện di các DNA này trên agarose gel.

Agarose là một trong các dạng của polysaccharide . Theo tính chất của nó, các nhà sinh học phân tử đã khai thác đặc tính thể gel trong điện di để phân loại các DNA. Agarose sẽ tạo thành hạt agarose sau khi tan (melting) ở nhiệt độ cao, hoặc đun sôi trong vài phút. Khi nguội lại, những hạt agarose sẽ kết tụ lại với nhau [gọi là gelling]. Giữa những hạt như vậy, có những lỗ rất nhỏ. Kích thước của những lỗ này có thể xê dịch chút ít tùy theo nồng độ của agarose gel. Trong điện trường, DNA di chuyển từ điện cực âm sang điện cực dương, vì DNA mang điện âm (do tính chất của gốc phosphate). Khi DNA di chuyển qua các lỗ của agarose, sự cọ xát giữa hạt agarose và phân tử DNA tạo ra lực kháng làm ngăn cản sự chuyển dịch này của DNA. DNA có phân tử càng lớn, thì lực cản càng mạnh. Do đó DNA có phân tử càng nhỏ di chuyển càng nhanh. Nhờ vậy người ta phân loại được các đoạn phân tử DNA trên agarose gel. Khi thay đổi nồng độ thể gel, kích thước lỗ giữa các hạt agarose cũng thay đổi. Nó sẽ trở nên lớn hơn khi nồng độ gel càng thấp. Khi kích thước lỗ to và phân tử DNA bé, thì sự khuếch tán sẽ gặp trở ngại. Người ta thấy rằng, cần có một sự tương xứng giữa hai yếu tố , để có được kết quả mong muốn trong khi nghiên cứu các đoạn DNA.

II.3.2. MARKER LÀ SẢN PHẨM CỦA PCR (PCR-BASED MARKER)

Phản ứng chuỗi polymerase được viết tắt PCR là tiến bộ kỹ thuật đã được ứng dụng rộng rãi trong những năm đầu của thập niên 1990. **Kary Mullis** người có công lớn trong phát hiện này, đã được lĩnh giải thưởng Nobel năm 1993

Nguyên tắc cơ bản của PCR

Phản ứng chuỗi của polymerase thường được viết tắt là PCR (polymerase chain reaction). Đây là một kỹ thuật phân tử tạo dòng DNA rất đơn giản và hiệu quả. Thông qua PCR, hàng triệu đoạn DNA đồng nhất có thể được thu thập một cách dễ dàng từ một hỗn hợp các phân tử bao gồm RNA, protein, polysaccharide, DNA không có chức năng và DNA có chức năng di truyền. Người ta còn gọi nó là kỹ thuật tạo dòng DNA *in vitro*. Ngày nay, PCR được dùng rất phổ biến trong nhiều lĩnh vực thuộc về sinh học.

PCR là kỹ thuật xử lý *in vitro* các chuỗi mã hoá di truyền DNA bằng cách phát triển primer một cách đồng loạt trên các dây đơn DNA. Toàn bộ tiến trình được hoàn thiện do sự biến chất (denature) của DNA cần thiết, sự tác động của primer tại đầu của các dây đơn DNA này, kể đến là sự phát triển của các primer do phản ứng DNA polymerase (hình 7-7).

DNA polymerase là một enzyme có chức năng tổng hợp các dây đơn DNA. Trong điều kiện cho phép nào đó, tiến trình tổng hợp DNA này có thể được sao chép *in vitro*. Ứng dụng đầu tiên của sinh tổng hợp DNA *in vitro* gồm có tạo chuỗi mã DNA thông qua phương pháp gây ảnh hưởng đoạn cuối của dây dideoxy của Sanger, phương pháp giải mã DNA đánh dấu, v.v...Tất cả những ứng dụng này đều có trong giai đoạn 1 [chu kỳ 1] của sinh tổng hợp DNA.

Vào năm 1985, một nhóm các nhà khoa học của Cetus Corporation đã tuyên bố có một cách mới trong sinh tổng hợp DNA *in vitro*, với thành tựu bước đầu về phản ứng chuỗi polymerase có tính chất tự động. Họ đã sử dụng qui trình khuếch đại chuỗi mã di truyền beta globin:

- Tạo dây đơn DNA cần nghiên cứu
- Cho các primer tác động DNA cần nghiên cứu
- Thêm polymerase để tổng hợp dây đơn bổ sung
- Lập lại bước 1 đến bước 3 với nhiều chu kỳ

Tuy nhiên, trong thiên nhiên vẫn có những sinh vật có thể sống sót ở nhiệt độ cao. Thí dụ polymerase được phân lập từ *Thermus aquaticus* có khả năng là vật thể ổn định về nhiệt lượng. *Taq* polymerase có hai thuận lợi chính: [i] hồi phục sau khi tác động nhiệt không cần kéo dài, [ii] enzyme này rất hoạt động ở nhiệt độ cao, lúc đó việc tác động của các primer ở đầu dây đơn sẽ chuyên biệt hơn và sinh tổng hợp DNA sẽ nhanh hơn.

Sự phát minh ra máy thermalcycler đã tạo điều kiện thuận lợi, giúp chúng ta có thể thay đổi nhiệt độ định kỳ theo một thời gian nhất định. Chiếc máy có tính chất chương trình hoá này đã hoàn thiện chu kỳ nhiệt một cách tự động, và người ta thường gọi nó là máy PCR.

DNA polymerase được dùng phổ biến là *Taq* polymerase, lấy từ *Thermus aquaticus*, có tính ổn định nhiệt rất cao. Một nửa chu kỳ của *Taq* polymerase được giữ ở nhiệt độ 94°C trong vòng 40 phút. *Taq* polymerase có một mức tối hảo về nhiệt độ cao trong sinh tổng hợp DNA [70-72°C]. Ở quãng nhiệt độ này, hoạt động đặc biệt của *Taq* polymerase có thể cao như 150 nucleotides / giây / enzyme. Do đó người ta phải cố gắng

phát triển ở quãng nhiệt độ 70-72°C trong vòng một phút. Từ đó hàng kilo base của các đoạn DNA có thể được tổng hợp.

Taq polymerase nhạy cảm với ion magnesium. Nồng độ tối hảo của Mg^{++} là 1,5 - 2,5 mM. Vì deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) có thể gắn với Mg^{++} , cho nên nồng độ chính xác của magnesium tùy thuộc vào nồng độ của dNTP. Các thành phần khác ít mẫn cảm với *Taq* polymerase là KCl và Tris.

Chất đệm:

Tris (pH 8.4)	10mM
KCl	50mM
MgCl ₂	1.5-2.0 mM

Các thành phần khác như các chất tẩy không có tính ion, gelatin, NP40, và Tween 20 được thêm vào với số lượng nhỏ nhằm thúc đẩy hoạt động của *Taq* polymerase. Nồng độ hiện được dùng là 0.01% và người ta còn tiếp tục thử nghiệm.

Primer và dNTP

Trong PCR tiêu chuẩn, người ta cần có một cặp mồi (primer). Sự khuếch đại chuyên biệt nào đối với một đoạn DNA cần nghiên cứu, đều phải tùy thuộc các primer tương xứng. Cả hai yếu tố: chiều dài primer và thành phần G+C đều có ảnh hưởng quan trọng đối với nhiệt độ trong quá trình tác động ở đầu dây đơn. Nhiệt độ này sẽ là $2x(\# \text{ của A+T}) + 4x(\# \text{ của G+C}) + 5^{\circ}\text{C}$. Nếu có 50% G+C, thì chiều dài của primer phải có kích thước tương ứng là 18-20 nucleotides.

Người ta mua các nucleotides ở các công ty hoá chất, có chất lượng tốt. Nếu nó được bảo quản ở dạng bột đông khô [freeze-dried powder]. Sau đó người ta phải điều chỉnh lại độ pH, trước khi sử dụng.

DNA mục tiêu

Người ta cần phải có các đoạn DNA mang mật mã đã biết trước, được gọi với thuật ngữ “target DNA” (DNA mục tiêu) trong kỹ thuật PCR. Người ta sẽ nhận được những kết quả tốt nhất, nếu DNA thật sự thuần khiết, DNA từ mô lá. Số lượng DNA cần cho một phản ứng không nhiều lắm, chỉ cần 5-10 ng DNA thuần khiết, đủ để cho những kết quả theo mong muốn. Người ta cần có ethanol trong lần cuối của qui trình chuẩn bị DNA. Với 10% ethanol, nó vẫn chưa có thể gây ảnh hưởng đến hoạt động của *Taq* polymerase.

Điều ghi nhận quan trọng là : phải có một mM EDTA trong chất đệm TE trong khi sử dụng để hoà tan DNA. EDTA sẽ gắn với Mg^{++} , sao cho thể tích của DNA mục tiêu không vượt quá 1/5 của thể tích PCR

Phát hiện DNA có tính đa hình nhờ PCR

Sản phẩm của PCR là những đoạn mã DNA. Khi DNA xuất phát từ hai dòng lai với nhau được khuếch đại lên nhờ các primer tại locus đặc biệt nào đó, thì trọng lượng phân tử của sản phẩm PCR này có thể rất khác nhau, vì có những thay đổi vật lý trên chuỗi mã DNA, nghĩa là, sự mất đoạn hay thêm đoạn DNA sẽ xảy ra trong vùng bị khuếch đại này. Thể đa hình được gọi là “amplicon length polymorphism” [ALP] phản

ảnh DNA có tính đa hình giữa các cá thể / các dòng lai / các giống lúa. Thuận lợi của ALP so với RFLP trong việc phát hiện này là: (1) nó rất nhanh, chỉ cần một ngày giúp ta tìm ra kết quả, (2) không có chất đồng vị, (3) rẻ tiền, (4) cần rất ít DNA. Bất lợi của ALP là người ta phải biết rõ chuỗi mã DNA đầu tiên khi tổng hợp primer.

II.3.2.1. RAPD marker

Một trong những giới hạn chính của PCR chuẩn đối với ALP marker là mọi thông tin về chuỗi mã di truyền đầu tiên phải được biết rõ trước khi chuẩn bị các primer tương ứng. Nhưng hiện nay, thông tin về các chuỗi mã này trên các vùng của genome cây lúa chưa được biết hết. Để phát hiện ra các thể đa hình DNA trên những vùng như vậy, người ta phải cải tiến kỹ thuật PCR. Vào năm 1990, có hai nhóm nghiên cứu đã thực hiện việc cải tiến này để phát hiện thể đa hình DNA bằng PCR tiêu chuẩn (William và ctv. 1990, Saiki và ctv. 1988, Michelmores và ctv. 1991)

Nguyên tắc: từ lâu người ta đã biết rằng việc khuếch đại một đoạn DNA đặc biệt nào đó có thể thu nhận được kết quả thông qua điều kiện nghiêm ngặt PCR. Nhưng các sọc không có tính chuyên biệt gì vẫn thể hiện ra trong điện di, một khi sự nghiêm ngặt này bị lơ lửng. Đặc biệt trong trường hợp nhiệt độ ở giai đoạn tác động của primer tại đầu dây đơn bị giảm thấp hơn T_m , sẽ có nhiều sọc bất thường thể hiện ra trên gel. Welsh và McClelland (1990) đã ghi nhận hiện tượng này và đã phát minh ra AP-PCR (arbitrary primer-PCR) (những mẫu có chuỗi trình tự ngắn, ngẫu nhiên)

II.3.2.2. SSCP marker

SSCP được viết tắt từ chữ “single-strand conformation polymorphism”. Chúng ta biết rằng ALP không phải luôn luôn được tìm thấy nếu những amplicons có cùng một độ dài, thậm chí trong trường hợp chúng có biến dị di truyền giữa những amplicons.

Người ta đã tìm thấy có sự chuyển dịch của đoạn DNA dạng dây đơn, ngắn, trong điều kiện chưa qua quá trình biến hoá DNA thành dây đơn (denaturation). Người ta giả định rằng: sự thay đổi chuỗi mã di truyền DNA là do sự thay đổi ngoại hình của dây đơn (single-strand conformation). Sự thay đổi này làm cho DNA chuyển dịch trên gel, tạo ra thể đa hình.

Trong phân tích SSCP, phản ứng chuẩn PCR đã hoàn thành. Sản phẩm của PCR này lại bị mở dây đơn lần nữa. Người ta ngâm các mẫu này trong nước đá. Bấy giờ hiện tượng “snap-back” sẽ xảy ra trên cấu trúc thứ cấp. Để tránh hiện tượng đứt gãy cấu trúc thứ cấp, các mẫu này phải được xử lý trong điều kiện lạnh. Nếu P^{32} được dùng trong PCR, thì phim chụp X quang sẽ thể hiện rõ trên gel. Nếu không, người ta sẽ dùng bạc để nhuộm gel. Nhuộm bạc trên DNA dây đơn (SS DNA) sẽ nhạy cảm gấp trăm lần hơn nhuộm ethidium bromide.

II.3.2.3. STS marker

Sự chọn lọc giống nhờ marker [MAS = marker-assisted selection] có thể làm tăng hiệu quả lai tạo giống cây trồng đối với những tính trạng rất khó phân lập kiểu hình. Mặc dù phương pháp này đã xây dựng được bản đồ gần như khá đủ với DNA marker, nhưng việc ứng dụng của những nhà chọn giống vẫn phải bị lệ thuộc vào chi phí rất đắt của công nghệ gen.

Kỹ thuật DNA marker trên cơ sở vị trí được đánh dấu có tính chất mã di truyền: "STS" viết tắt từ chữ sequence-tagged sites, là một cách để khắc phục trở ngại nói trên.

Khái niệm STS do Olson và ctv (1989) đề xuất. Trong khi đánh giá hiệu quả PCR trên lĩnh vực nghiên cứu genome con người, họ ghi nhận những chuỗi mã DNA dạng copy đơn của một vị trí đã biết rồi trên bản đồ, có thể được xem như một marker, để lập bản đồ di truyền và bản đồ vật lý các gen quan trọng trong các nhiễm sắc thể.

Thay vì bảo quản, duy trì vật liệu sinh học, các nhà khoa học bảo quản các thông tin có tính chất điện tử [electronic information], vì nó dễ nhận ra, sắp xếp theo thứ tự, và lan truyền. Những marker được lưu trữ có tính chất điện tử này đã được gọi là STS. Ứng dụng STS để phát triển các bản đồ vật lý từ những bản đồ di truyền, đang được tiến hành trong nhiều chương trình nghiên cứu, kể cả cây lúa (Inoue và ctv. 1994).

STS-based PCR và kỹ thuật marker phân tử

Một STS là một đoạn ngắn của chuỗi mã di truyền, được tìm thấy bởi PCR (Saiki và ctv. 1985). Mỗi STS được ghi nhận trên bản đồ, tại một vị trí chuyên biệt nào đó như là một ranh giới (landmark) trong genome. Do vậy người ta còn dùng thuật ngữ "**standard landmarks**" để chỉ STS marker. Kỹ thuật PCR có vẻ thích hợp hơn kỹ thuật DNA blotting trong chọn lọc giống nhờ marker (MAS). Nó yêu cầu DNA có số lượng và chất lượng thấp hơn DNA blotting. Do đó, qui trình ly trích DNA có thể được cải tiến đơn giản hơn, mà vẫn tránh được hiện tượng mẫu lớn. Nó còn có tính tự động hóa rất cao, không phải sử dụng phóng xạ, hay yêu cầu các hệ thống tìm kiếm có tính chất hóa sinh phức tạp (Zheng và ctv. 1995). STS-based PCR có ưu điểm là một bộ phận giản đơn, có tính sinh sản nhanh trên gel: agarose hoặc polyacrylamide. Bộ phận này dễ nhận thấy và dễ diễn giải, trong hầu hết các trường hợp nó là "codominant". Những marker như vậy cho phép thể dị hợp có thể được phân biệt với hai thể đồng hợp.

PCR-based markers

Biến thiên di truyền giữa hai giống lúa có thể được phân tích nhờ khác biệt về độ dài của đoạn DNA đặc biệt nào đó thông qua kỹ thuật PCR, với cùng một cặp mồi. Vì sản phẩm của PCR được gọi là amplicon, cho nên biến thiên như vậy được gọi là amplicon length polymorphism (ALP). Khi không có ALP nào được phát hiện bởi một cặp mồi giữa hai giống, người ta áp dụng kỹ thuật PCR-based RFLP (viết tắt là PBR), với một restriction enzyme nào đó, cho thêm vào để tiêu hoá amplicon này. Việc xác định enzyme này cần làm với hàng loạt xét nghiệm, cho đến khi nào tìm được đa hình xảy ra trên điện di.

Trước đó cặp primer (F và R) được thiết kế sau khi chạy sequence RFLP marker cần thiết. Việc thiết kế này tùy thuộc vào kinh nghiệm và kỹ năng của người làm việc trong phòng thí nghiệm.

Cả hai ALP và PBR đều được xem như là PCR-based marker

Thí dụ trong bảng 7-6 cho thấy các STS primer được dùng để tìm xem gen kháng có chứa trong bố mẹ và con lai. Trong trường hợp *Xa-21* và *Pi-12 (t)*, chúng ta không cần

tiêu hoá với một enzyme tương ứng, nó vẫn cho đa hình, người ta gọi là là ALP. Trường hợp *Pi-2* và *xa-5*, người ta phải sử dụng enzyme tương ứng để tiêu hoá sản phẩm PCR, nó mới cho kết quả đa hình mong muốn, người ta gọi đó là PBR

II.3.2.4. Microsatellite marker

Những marker vi vệ tinh (microsatellite) đã được ứng dụng khá thành công từ 1995 đến nay. Nó được dùng để phát hiện các bệnh ung thư thường gặp trên người. Nó cũng được dùng để phát hiện các gen có ích trong thực vật, sự liên hệ về huyết thống

II.3.2.5. AFLP marker

AFLP là chữ viết tắt của Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism. Nó được áp dụng cho kỹ thuật **DNA fingerprinting** (kỹ thuật in dấu vân tay) để tìm kiếm tính chất đa hình của DNA giữa các mẫu xét nghiệm khác nhau. Những sản phẩm “fingerprint” này có thể được xem như một công cụ nhằm xác định sự phân lập của một mẫu DNA đặc biệt nào đó. Những “fingerprint” cũng được dùng làm nguồn cung cấp các marker di truyền, hình thành bản đồ liên kết gen..

Kỹ thuật DNA fingerprinting đã và đang được phát triển khá thành công với hai hướng chiến lược nghiên cứu như sau:

- Fingerprinting trên cơ sở lai, có tính chất kinh điển: bao gồm kỹ thuật cắt DNA bằng restriction endonuclease tương ứng, kỹ thuật điện di, RFLP được phát hiện bởi kỹ thuật lai với probe thông qua xét nghiệm Southern.
- Fingerprinting trên cơ sở PCR: bao gồm kỹ thuật khuếch đại DNA *in vitro* bằng primer đặc biệt hay primer ngẫu nhiên, kỹ thuật polymerase trong máy thermocycler. Sản phẩm PCR được phân biệt nhờ điện di trên gel, được phát hiện nhờ phương pháp nhuộm hoặc phương pháp đánh dấu primer. Kỹ thuật đã được sử dụng theo chiến lược này là RAPD, DAF, AP-PCR (bảng 7-2).

Kỹ thuật AFLP là kỹ thuật DNA fingerprinting, kết hợp cả hai chiến lược này. Nó dựa trên cơ sở khuếch đại có chọn lọc (selective amplification) một subset các đoạn DNA đã bị cắt, sử dụng trong PCR. Mẫu DNA được tiêu hoá với enzyme nội sinh, và adapters của dây đôi được gắn vào đầu dây DNA để phát sinh ra dây đơn “template” (mang mã ngược với dây gốc), sau đó cho khuếch đại nhờ kỹ thuật PCR.. Chuỗi mã của những adapters và vị trí tương ứng của nó trên dây DNA hoạt động như một primer ở vùng gắn vào nhau, để liên tục khuếch đại các đoạn DNA. Những nucleotide có tính chọn lọc phát triển thành những đoạn phân cắt, được bổ sung thêm vào đầu 3’ của PCR primer. Do đó, chỉ có những subset của các đoạn DNA này mới được ghi nhận. Chỉ có những đoạn phân cắt mà nucleotides của nó định vị xung quanh “restriction site” che khuất các nucleotide có tính chọn lọc, mới có thể được khuếch đại. Subset của những đoạn DNA được khuếch đại sẽ đem phân tích thông qua điện di trên polyacrylamide gel để có sản phẩm “fingerprint”.

Thành công của kỹ thuật AFLP tùy thuộc vào phản ứng của enzyme tiêu hoá có trọn vẹn hay không? Do đó, chúng ta phải thận trọng trong việc phân lập DNA có chất lượng cao, không làm tạp nuclease hoặc ức chế nó

Số lượng C và G trong các nucleotide có tính chọn lọc sẽ rất quan trọng quyết định số đoạn phân tử được khuếch đại. Thông thường, càng nhiều C và G có trong primer, thì các đoạn phân tử DNA được khuếch đại càng ít. Tương tự như vậy, nếu kích

thước genome càng nhỏ, số đoạn phân tử được khuếch đại sẽ càng ít, và fingerprint càng đơn giản hơn rất nhiều.

Protocol đầu tiên cho kỹ thuật AFLP do Zabeau và Vos (1993) nhấn mạnh đến sự quan trọng của việc làm thuần khiết hai enzyme sử dụng, sau đó là chuẩn bị adapter và thiết kế primer một cách thận trọng. Ngày nay nó đã được cải tiến khá nhiều với những công dụng như sau:

- Công cụ có hiệu quả phát hiện tính chất đa hình
- Xây dựng bản đồ di truyền có mật độ cao của genome
- Xây dựng bản đồ DNA marker có hiệu quả nhất so với những marker khác Khả phá ra những clone của genome, thí dụ YAC
- Fingerprinting các đoạn DNA đã được “cloned” như cosmid, P1, BAC, YAC

II.4. Các tính trạng phân tích trên phẩm chất

II.4.1. Mùi thơm

Lúa thơm có vị trí đặc biệt trong thị trường gạo xuất khẩu với giá trị kinh tế cao. Căn cứ trên sự thể hiện mùi thơm của hạt cơm, người ta phân ra hai kiểu gen cây lúa: thơm (aroma) và không thơm (non-aroma). Thuật ngữ aroma xuất phát từ nhựa (resine), dầu hương dầu (baldams) thực vật xem như thành phần của mùi thơm được đánh dấu bằng một chỉ thị là mùi. Mùi thơm hay còn gọi là bột thơm khi nấu cơm mùi vị bốc hơi cho thấy một hợp chất chính của formaldehydes, ammonia và hydrogen sulfide. Một số nhà nghiên cứu cho rằng có sự gia tăng chất propanol, pentanal, và hexanal trong thời gian dự trữ. Hơn 100 thành phần chất bột như hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, acids, esters, phenols, pyridines, pyrazines, và thành phần khác khi nấu cơm (Tsugita 1986).

Người ta đã chứng minh rằng mùi thơm của hai giống lúa basmati 370 và Khao Dawk Mali 105 do hợp chất 2-acetyl-1-pyrroline. Emmanuel (1993) thông qua công cụ HPLC trên mẫu gạo IR64, Azucena, và Basmati, các hợp chất pentanol, hexanol, benzaldehyde, and 2-acetyl-1 pyrroline đều có ảnh hưởng nhất định đến mùi thơm, trong đó 2-acetyl-1-pyrroline là thành phần chính trong mùi thơm của gạo.

Gen điều khiển mùi thơm của của gạo đã được nhiều tác giả nghiên cứu, với nhiều kết luận khác nhau.

- một gen lặn (Ghose và Butany 1952, Sood và Siddiq 1978, Berner và Hofl 1986)
- một gen trội (Kadam và Patankar 1938)
- hai gen lặn, hoạt động bổ sung (tỉ lệ 7:9 ở F_2) (Tripathi và Rao 1979)
- hai gen lặn, hoạt động lặp đoạn (tỉ lệ 1:15 ở F_2) (Dhulappanavar và Mensinkai 1969)
- hai gen lặn, một gen hoạt động như một yếu tố ức chế (tỉ lệ 3:13 ở F_2) (Charkravarty 1948, Tsuzuki và Shimokawa 1990)
- ba gen lặn (tỉ lệ 27:37 ở F_2) (Kadam và Patankar 1938, Nagarju và ctv. 1975, Reddy và Sathyanaraynaiah 1980)

- bốn gen lặn (tỉ lệ 81:175 ở F₂) (Dhulappanavar 1976)
- đa gen (Richharia và ctv. 1965)

Tại Đại học Cornell, Ahn và ctv. (1992) đã áp dụng RFLP marker để nghiên cứu gen điều khiển tính trạng mùi thơm cây lúa. Đó là một gen lặn, ký hiệu *fgr*, định vị trên nhiễm sắc thể số 8, liên kết chặt với marker RG28, khoảng cách di truyền giữa marker này và *fgr* là 4,5 cM. Nhiều tác giả đang cố gắng thiết kế primer của RG28, để ứng dụng trong kỹ thuật chọn lọc giống lúa thơm, nhờ marker phân tử (MAS). Cho đến nay, việc lai tạo giống lúa cải tiến có phẩm chất gạo thơm rất ít thành công, so với việc khai thác tính trạng này từ giống lúa cổ truyền như Basmati (Ấn Độ), Khao Dawk Mali (Thái Lan), năng Tjơm Chợ Đào, tám Thơm (Việt Nam).

Nghiên cứu di truyền tính trạng mùi thơm trong cây lúa cho thấy nó được điều khiển bởi một gen lặn (Dong và ctv. 2000). Việc xác định chỉ thị phân tử liên kết rất gần với gen này sẽ tạo thuận lợi cho nhà chọn giống trong quá trình chọn lọc cá thể có gen thơm, và xác định tính chất đồng hợp hoặc dị hợp tại locus mục tiêu, nó còn có thể rất hữu ích trong mục tiêu đưa gen điều khiển mùi thơm vào các dòng con lai mong muốn. Ahn và ctv. (1992) ghi nhận một DNA marker liên kết rất gần với gen thơm *fgr* trong cây lúa. Các đoạn nhiễm sắc thể được du nhập từ giống cho (donor) Della được phân biệt nhờ RFLP trong quần thể con lai NIL. Phân tích RFLP cho thấy: gen được liên kết đối với một clone DNA có tính chất sao chép, RG28 định vị trên nhiễm sắc thể số 8 với khoảng cách di truyền 4,5cM. Do đó, người ta đã nghĩ đến một cơ hội rất tốt cho việc thực hiện MAS. Bởi vì mùi thơm chịu ảnh hưởng bởi môi trường rất mạnh mẽ. Có khi dòng con lai có gen *fgr* nhưng không thể hiện mùi thơm, và chúng ta đã vô tình loại bỏ nó đi trong quá trình chọn lọc dựa trên đánh giá kiểu hình.

Các phương pháp đánh giá mùi thơm

Đánh giá về kiểu hình mùi thơm rất khó, người ta phải nghiên cứu bổ sung nhiều phương pháp để đánh giá mùi thơm một cách chính xác hơn

- Nhai nửa hạt gạo hoặc vài hạt, phương pháp này đòi hỏi nhiều thời gian, không đánh giá chính xác vì giữa các người tham gia đánh giá cảm quang đều cho kết luận khác nhau, phương pháp hoàn toàn mang tính cảm quang (Berner và Haff 1986, Dhulappanavar 1976)
- Đun nóng cây lúa trong nước: Lấy một phần cây bao gồm hạt, lá và thân ở giai đoạn đẻ nhánh và đun trong nước nóng, rồi đánh giá khi mùi thơm bốc ra (Nagaraj và ctv. 1975). Phương pháp này cũng không thật sự ổn định vì chất diệp lục cũng có mùi thơm rất mạnh, làm ảnh hưởng sai lệch khi kết luận giống thơm hoặc không thơm.
- Phương pháp thử nghiệm alkali: Sood và Siddique (1978) dùng 2 gram bột lá xanh đặt trong đĩa petri nhỏ có nắp đậy, sau đó cho vào 10 ml dung dịch 1,7% KOH. Sau 10 phút, mùi thơm được đánh giá thông qua các chuyên gia người. Tất cả các thành phần của cây bao gồm thân, lá, bông, hạt đều có thể được đánh giá
- Phương pháp alkali cải tiến : Berner and Hoff (1986) đề xuất một phương pháp cải tiến từ phương pháp xét nghiệm alkali của Sood and Siddique (1978). Lấy hai lá từ một cây (2.5cm chiều dài tương đương với 1gram), đặt chúng trong ống nghiệm 20 ml, duy trì ở nhiệt độ lạnh. Sau đó, chúng được lấy ra để đánh giá với

10 người đánh giá cho điểm từ 1 đến 10. Thang điểm 1-9 xem như không mùi và thang điểm 10 xác định có mùi thơm

- Phân tích số lượng : Buttery (1985) cho rằng vai trò chính của thành phần lá pandan quyết định mùi thơm với sự tổng hợp 2-acetyl-1-pyrroline. Do đó, phân tích số lượng của hợp chất này sẽ khẳng định mùi thơm của giống lúa.
- Phân tích hóa học : Linkers và Nikerson (1964) đề xuất phương pháp chưng cất hơi nước. Sử dụng sắc ký khí để phân biệt thành phần hóa học của mùi, mỗi thành phần được đánh giá bởi ảnh hưởng trong sự phá vỡ cân bằng của hạt .

II.4.2. Hàm lượng amylose

Trong các tính trạng về phẩm chất cơm, amylose được xem là tính trạng có ý nghĩa quyết định đến sự mềm cơm hoặc ngược lại. Hàm lượng amylose cao có tính trội không hoàn toàn so với hàm lượng amylose thấp, nó do một gen điều khiển kèm theo một số modifiers (gen phụ có tính chất cải tiến) (Seetharaman 1959, Kahlon 1965, Ghost và Govindaswamy 1972, Heu và Park 1976). Các thể đột biến về amylose cũng được nghiên cứu trên giống lúa japonica với hai dạng hình 2064 và EM16 tương tác theo kiểu “allelic”. Các mutants này có thể được chuyển sang giống lúa indica nhờ lai lui với IR36 hai lần. Do đó gen điều khiển sự co dẫn hàm lượng amylose *ae* (amylose extender) được xác định trên nhiễm thể số 2 (Kaushik và Khush 1991). Sử dụng microsatellite marker, người ta đã phân loại các nhóm amylose (gen *Wx*) trong quỹ gen cây lúa (Ayres và ctv. 1997). Thành tựu có ý nghĩa trong nghiên cứu di truyền phân tử về phẩm chất cơm có thể được ghi nhận qua công trình: bản đồ liên kết gen hệ enzyme III của tinh bột trong hạt gạo của Harrington và ctv (1997) trên nhiễm thể số 2, với hai marker kề cận *CDO 718* và *RG157*.

Tinh bột chiếm tỉ lệ 90% trong hạt gạo, và được hình thành do hai đại phân tử : amylose (chuỗi thẳng) và amylosepectin (chuỗi phân nhánh). Gen “waxy” còn gọi là gen điều khiển hàm lượng amylose. Hàm lượng amylose có trong phôi nhũ của hạt. Hàm lượng amylose là yếu tố rất quan trọng trong đánh giá chất lượng giống lúa. Dựa vào hàm lượng amylose trong hạt gạo, các giống lúa được phân ra làm hai nhóm waxy (1-2%) và nonwaxy >2%. Đối với nonwaxy chia ra làm ba nhóm : hàm lượng amylose thấp (AC = 10-20%), hàm lượng amylose trung bình (AC = 20 đến 25%) , hàm lượng amylose cao thương cứng cơm (AC >25%). Tất cả các mẫu giống Basmati của Ấn Độ và Pakistan, giống Sadri được xếp chung vào nhóm hàm lượng amylose trung bình. Hàm lượng amylose chịu ảnh hưởng trong thời kỳ chín hạt. Các thể đột biến về amylose cũng được nghiên cứu trên giống lúa japonica với hai dạng hình 2064 và EM16 tương tác theo kiểu “allelic”. Các mutants này có thể được chuyển sang giống lúa indica nhờ lai lại với IR36 hai lần. Do đó gen điều khiển sự co dẫn hàm lượng amylose *ae* (amylose extender) được xác định trên nhiễm thể số 2 (Kaushik và Khush 1991).

Tinh bột chiếm tỉ lệ 90% trong hạt gạo, và được hình thành do hai đại phân tử: amylose (chuỗi thẳng) và amylosepectin (chuỗi phân nhánh). Gen “Waxy” còn gọi là gen

điều khiển hàm lượng amylose. Hàm lượng amylose có trong phôi nhũ của hạt. Hàm lượng amylose là yếu tố rất quan trọng trong đánh giá chất lượng giống lúa

- Tinh bột chia ra hai thành phần còn gọi là polysaccharide: Sợi thẳng amylose (20-30%) và amylopectin (70-80%). Amylose là thành phần phân tử quan trọng bao gồm α -1,4 liên kết α -D glucopyranosyl (α -D Glcp)
- Amylosepectin là sợi nhánh thành phần phân tử của chuỗi amylose và nhánh liên kết với α 1,6 – glucosidic. Do đó sự hiện diện của nhánh enzyme (Q enzyme) và α -1,6 vô cùng cần thiết.
- Tinh bột được dự trữ trong các tổ chức “amyloplasts”, và amyloplasts được chia ra thành nhiều proplastids. Các amyloplast định vị ở chung quanh hạt tinh bột. Số hạt tinh bột trong các giống cây khác nhau. Riêng lúa thì các hạt này nhiều hơn.
- Tinh bột không những dự trữ carbohydrate mà còn có đường polymer

Phôi nhũ chứa hai kiểu tinh bột: thứ nhất là GBSS (granule-bound starch synthase) và thứ nhì là soluble starch synthase (SSS), hai hợp chất này được tác động chặt chẽ với bởi enzyme của tinh bột để tổng hợp amylopectin.

Chủ yếu kiểu gen GBSS I với độ lớn 60kDa, vì thế người ta gọi đó là protein Wx. Protein Wx là enzyme quan trọng trong tổng hợp amylose và Wx loci

Hàm lượng amylose trong phôi nhũ của gạo là chìa khóa quyết định chất lượng gạo. Tỷ lệ hạt tinh bột trong lúa cũng thay đổi tùy loại giống. Loại hình japonica thường biến động 10- 22% trong khi đó loại hình indica thường biến động 20-30%. Do đó việc cải tiến cây lúa để giảm hàm lượng amylose cực kỳ khó khăn.

Cơ chế tổng hợp hàm lượng amylose là quá trình xúc tác của các hạt tinh bột bao chung quanh GBSS protein (granule-bound starch synthase). GBSS được biết thông qua locus waxy (Wx) (Okagaki và Wessler 1988). Một báo cáo khoa học đã ghi nhận sự tích lũy tinh bột amylose tự do trong waxy đột biến tạo một gen đặt biệt trong cây bắp (Sprague và ctv 1943), lúa mì (Ainsworth và ctv 1983), và lúa (Sano 1984, Okagaki và Wessler 1998). Nghiên cứu di truyền phân tử, gen điều khiển hàm lượng amylose của lúa mạch nằm trên đoạn ngắn của nhiễm sắc thể số 1 (Kleinhofs 1997). Trên cây lúa *Oryza sativa*, vị trí gen amylopectin nằm trên nhiễm sắc thể số 6.

Chiến lược nghiên cứu antisense RNA có kết quả trên lúa indica, sự điều hòa của gen trong quá trình tổng hợp tinh bột chứa và dự trữ trong các tổ chức của cây Waxy protein, một waxy gen sản xuất bao chung quanh tinh bột gọi là GBSSI (granule bound starch synthase I) giúp cho tổng hợp amylose trong các mô dự trữ trong thực vật. Trong lúa mì sáu bội thể có ba gene *wx*, *Wx A1*, *B1* và *D1* (Chao và ctv 1989, Nakamura 1993). Enzyme tổng hợp tinh bột là SS (starch synthase) và BE (branch enzyme) được tìm thấy trong mô dự trữ.

Nhiều enzyme được tìm thấy trong các hạt tinh bột. Trong thời gian tổng hợp tinh bột, những enzyme này xuất hiện trong các lớp dung dịch gọi là stroma và crystalline granule. Phần lớn enzyme tác động ảnh hưởng trong stroma

Enzyme GBSSI (Granule bound starch synthase I) tìm thấy trong quá trình kết gán các hạt tinh bột. Sự hiện diện GBSSI quyết định sự tổng hợp amylose (Kuipers và

ctv 1994). Những thí dụ khác cho thấy quan hệ của hạt tinh bột bao gồm sự tổng hợp của tinh bột khác hơn là GBSSI (Cao và ctv 1999)

Cải tiến nhanh hàm lượng amylose với promoter CaMV35S được đưa vào cây chuyển gen (Shimada và ctv 1993). Tuy nhiên cải tiến giống lúa với sự giảm hàm lượng amylose diễn ra rất chậm. Yao và ctv (1996) báo cáo rằng promoter Wx từ lúa indica cho kết quả thể hiện gen rất mạnh, đặc biệt là trong phôi. Tiếp theo Tereda và ctv (2000) cũng chứng minh hàm lượng amylose trên giống thuộc loại hình japonica giảm hàm lượng amylose nhờ antisense của gen Wx mang promoter Wx. Tuy nhiên, hàm lượng này vẫn cao ở giống thuộc loại hình indica. Liu và ctv (2003) tiếp tục cải thiện hàm lượng amylose và đưa gen antisense Wx (được thiết kế), rồi chuyển nó vào cả hai loại hình japonica và indica để giảm hàm lượng amylose trên phôi lúa bằng antisense RNA. Cấu trúc này chứa 756bp gen waxy và gusA được đưa vào cây lúa thông qua chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium*. Hơn 200 cây chuyển gen được kiểm chứng bằng Southern blot và Northern blot với mẫu trích từ phôi mRNA lúc chín. Người ta ghi nhận mRNA ở giai đoạn chín làm giảm tổng hợp amylose và ghi nhận 96% cây lúa được thay đổi và giảm hàm lượng amylose. Liu và ctv (2003) ghi nhận hàm lượng amylose ổn định 9 thế hệ liên tiếp trong cây chuyển gen

Người ta áp dụng microsatellite để xác định ba gen: “wx gene granule”, “bound starch synthase I”, và “SSE” – gen mã hóa men tổng hợp tinh bột I có trong 56 giống lúa (Bao và ctv 2002).

Xu và ctv. (1995) cho rằng hàm lượng amylose có thể liên quan ảnh hưởng chính bởi tam bội thể của phôi nhũ. Người ta tạo ra quần thể F₂ và thiết lập bản đồ QTL kiểm soát chất lượng lúa gạo (He và ctv 1997). He ctv (1999) đã tìm thấy AC được kiểm soát bởi gen chính định vị trên nhiễm sắc thể số 5 và 6 với gen wx và các alen chính giải thích biến thiên di truyền 91,1%. Đó là hai marker RG573-C624 định vị trên nhiễm sắc thể số 5 và wx trên nhiễm sắc thể số 6.

Mới đây, Yanagisawa và ctv (2003) đã dùng kỹ thuật SNP (single nucleotide polymorphism) và dCAPS (derived cleaved amplified polymorphic sequence marker) đối với gen *Wx-D1*. Đây là tính trạng waxy trong lúa mì. Nó thể hiện wx-D 1 protein theo kết quả phân tích “immunoblot”. Điều này có thể giúp cho chúng ta chọn lựa marker để tìm thấy các alen đột biến trong các dòng phân ly. Hơn nữa, điểm đột biến trong gen có thể làm cho thay đổi hình dạng. Phương pháp SNP mở ra triển vọng mới, giúp chọn nhà chọn giống nghiên cứu nhanh các alen.

Nghiên cứu di truyền số lượng của amylose cho thấy:

Chất lượng gạo tương quan chặt chẽ với chất lượng xay chà. Hàm lượng amylose cao, độ bền gel cứng và độ trở hồ cao là yếu tố chính ảnh hưởng đến chất lượng gạo của loại hình indica. Nghiên cứu tương tác giữa kiểu gen với môi trường trên hạt lúa cho thấy tế bào chất cũng có ảnh hưởng rất quan trọng. Tế bào chất có thể được xem là môi trường bên trong. Trung bình ưu thế lai trên tế bào chất đạt giá trị khoảng 5%. Vai trò của cây mẹ được nhấn mạnh trong chương trình cải tiến giống lúa có phẩm chất tốt.

Hàm lượng amylose trong lúa được kiểm soát trực tiếp bởi ảnh hưởng cộng (A) và ảnh hưởng tương tác không alen tính cộng x tính cộng (AE). Ảnh hưởng tương tác

AmE cũng rất quan trọng đến hàm lượng amylose. Do đó, người ta khuyến cáo có thể cải tiến hàm lượng amylose trong thế hệ những thế hệ phân ly đầu tiên trong chọn giống (Shi và ctv 1997).

Tế bào chất (cytoplasmic effect) có ảnh hưởng một ít đến hàm lượng amylose. Tính chất trội (D) và Dm ảnh hưởng do tương tác với môi trường rất có ý nghĩa.

Vai trò quan trọng của tính cộng và trội quyết định biến động di truyền trên hàm lượng amylose và ảnh hưởng epistasis đều cần được xem xét trong từng trường hợp cụ thể

Di truyền tính trạng hàm lượng amylose rất phức tạp vì mô hình 3 alen (3n trong nội nhũ) của nó (Pooni và ctv 1992). Hàm lượng amylose cao được kiểm soát bởi hai cặp gen bổ sung (Stansel 1966). Một vài nghiên cứu cho rằng hàm lượng amylose là đa gen (Puri 1980). Trong phân tích hệ di truyền, hàm lượng amylose do ảnh hưởng của cả hai nhóm alen cộng tính (additive) và alen không cộng tính (dominant). Somith và ctv (1979) kết luận rằng hàm lượng amylose chịu ảnh hưởng của tương tác tính cộng x tính cộng, tương tác epistatic và tương tác trội x trội.

MUÛC TIÊU

Âão tàii năõy nhăom vaào caïc muüc tiău nhă sau:

- Khai thác biến đổi soma vài tuổi phâun và đánh giá giống thông qua marker phân tử âăø choùn giăúng

NĂUI DUNG

Năui dung 1: Khai thác văt liău thăng qua phăn têch di truyăõn của văt liău

Năi dung 2: Ęĩng duông nuăi cáúy tuăi phăun, xăi lyăi biăun đă soma trong choùn taũo đoiğ luă coi phăøm cháút cao bao găøm luă thăm âăuc săin

Nôı dung 3: Đănh giá marker phân tử

Năui dung 4: Choùn loũc caïc giăúng luă ngoăi âăõğ

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

vật liệu

Các dòng phục vụ cho nuôi cấy túi phấn

Một số đặc điểm các giống trong tổ hợp lai để cấy túi phấn và tế bào soma

TT	Tên giống	Đặc điểm
1	IR 64	Năng suất cao, ngon cơm, thời gian sinh trưởng ngắn
2	OM 1490	Thấp cây, năng suất cao, ngắn ngày
3	OMCS 2000	Ngắn ngày, ít bạc bụng, năng suất cao
4	Khao dawk Mali 105	Thơm, ngon cơm, cao cây, phẩm chất tốt
5	DS 20	Năng suất cao, ngắn ngày, Thơm, ngon cơm
6	Jamine 85	Năng suất cao, ngắn ngày, Thơm, ngon cơm
7	OM 3536	Năng suất cao, ngắn ngày, Thơm, ngon cơm, protein cao

8	OM 4392	Giàu vitamine, năng suất cao (do chuyển gen IR 64)
9	Tequing	Japonica, nguồn gốc Trung Quốc, và năng suất cao
10	Nàng thơm chợ đào	Ngon cơm, thơm dẻo, dài ngày

Phương pháp:

Phương pháp nuôi cấy tế bào soma

Nuôi cấy tế bào soma

- Bóc vỏ hạt gạo và rửa trong cồn 70% cồn trong 1 phút và rồi trong 45% chlorox (5-25% Na Hypochlorite với 1-2 giọt Tween trong 20- 30 phút
- Rửa hạt với nước cất 5 lần
- Ủ hạt trong môi trường (MS) (Murashige and Skoog) với 2mg 2,4D /l
- Để môi trường trong tối
- Sau 3-4 tuần , tách mô sẹo từ phôi và ủ trong môi trường M S cho chúng phát triển
- Ủ trong tối 27 °C
- Cấy mô sẹo sau 3-4 tuần
- Chuyển qua môi trường dung dịch Yoshida

Phương pháp nuôi cấy túi phấn

Hạt lai F₁ được gieo làm hai đợt cách nhau 1 tháng trồng trong nhà lưới .

Bông lúa non được thu khi khoảng cách từ gốc lõ đồng đến gốc lõ thứ nhất từ 5- 10cm và xử lý lạnh 100C trong 10 ngày. Hạt phấn lúc này ở giai đoạn cuối đơm phấn và thích hợp cho nuôi cấy

Túi phấn được tách ra khỏi vỏ trấu , xử lý cồn 70 độ trong 1 phút và 0,1 % HgCl₂ trong 15 phút và rửa sạch nhiều lần bằng nước cất tuyệt trùng . Túi phấn của các cây trồng trong đợt đầu sau đó được nuôi trong môi trường N6 có bổ sung kích thích sinh trưởng theo 2 nghiệm thức.

- I. 0,5mg/12,4 D + 1,0 mg /L NAA+ 0,5mg /L BAP (nền N6)
- II. 0,5 mg/ 1 2,4 D +1,0 mg /L NAA+ 0,5mg /L BAP (nền MS)

Thí nghiệm bố trí ba lần lặp lại , mỗi bình cấy 20 hạt lúa =120 túi phấn

Vật liệu để trong tối 25oC

Mô sẹo hình thành đường kính 2-3mm được tái sinh trong môi trường MS có bổ sung 1mg/ l BAP , 1mg/l NAA) ở 25 °C và 12 giờ chiếu sáng

Cây tái sinh được nhân vô tính trên môi trường MS có bổ sung 2mg/l BAP

Một nửa số cây trong cùng dòng được tạo ra trên môi trường MS không chất kích thích sinh trưởng .Cây có bộ rễ phát triển được trồng trong môi trường dinh dưỡng Yoshida

Các dòng cho hạt lép được giữ trong phòng được xử lý colchicine ở nồng độ 0,05% trong 10 giờ hoặc trong tối 5 giờ.

Đánh giá môi trường

Môi trường theo bốn nghiệm thức

0,5mg/12,4 D + 1,0 mg /L NAA+ 0,5mg /L BAP (nền N6)

0,5 mg/ 1 2,4 D +1,0 mg /L NAA+ 0,5mg /L BAP (nền MS)

(MS+1mg. l⁻¹ Kinetin + 0,5mg.l⁻¹ NAA+ 2mg. l⁻¹ BAP

Thí nghiệm bố trí ba lần lặp lại , mỗi bình cấy 20 hạt lúa =120 túi phấn

Ghi chú:

MS: Môi trường Murashige-Skoog

2,4-D: Dichlorophenoxy acetic acid

NAA: α - Napthalene acetic acid

Đánh giá năng suất, thành phần năng suất và phẩm chất một số tính trạng

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, 3 lần lặp lại. Bộ giống khảo nghiệm được thực hiện bằng phương pháp cấy (15x20 cm, 1 tép / bụi), phân bón 80-40-30 kg NPK/ha vụ hè thu, và 100-30-30 kg NPK/ha vụ đông xuân. Bộ giống so sánh năng suất trên diện rộng theo kỹ thuật canh tác cửa nông dân, ổ ổ ỹc àùp dưỡng kỹ thuật say, mỗ ỹt ổ ỹ 150 kg / ha, mọ ỹi lọ 20 m². Mọ ỹu năng suọ ỹt ổ ổ ỹc gàyt lầ ỹ 10 m².

-Các chỉ tiêu nông học:

Ngày trỗ được ghi nhận khi quân thể lúa trỗ 50%

Chiều cao được đo từ mặt đất đến đỉnh bông cái

Năng suất và thành phần năng suất:

Số bông /bụi: $P / \text{số bụi thu thập}$

Số hạt chắc/ bông: $(f/v) \times (W+w) / P$

Trọng lượng 1000 hạt: $(W/f) \times 1000$

Năng suất được quy về 14% ẩm độ

(P: tổng số bông đếm được trên các bụi lúa đã chọn làm mẫu, f: tổng số hạt chắc / bông cái, W: trọng lượng hạt chắc trên tất cả bông lúa)

-Chất lượng xay chà: 200 g mẫu lúa được sấy khô ở ẩm độ hạt 14%, được đem xay trên máy McGill Polisher no. 3 của Nhật. Các thông số về tỉ lệ gạo lức, tỉ lệ gạo trắng, tỉ lệ gạo nguyên được thực hiện theo phương pháp của Govindewami và Ghose (1969)

-Hình dạng và kích thước hạt được đo bằng máy Baker E-02 của Nhật và phân loại theo thang điểm IRRI (1996)

-Độ bạc bụng được cho điểm theo SES (IRRI 1996)

-Hàm lượng amylose được phân tích trên máy so màu, theo phương pháp của Sadavisam và Manikam (1992)

-Độ trở hồ được đo bằng phương pháp lan rộng và độ trong suốt của hạt gạo với dung dịch KOH 1,7% trong 23 giờ ở 30^oC.

-Độ bền thể gel được phân tích theo phương pháp của Tang và ctv. (1991) và phân loại theo tiêu chuẩn SES (IRRI 1996)

■ Tiêu chuẩn đánh giá phẩm chất hạt theo thang điểm (IRRI 1996) và cải tiến theo Lang 2002

Độ bạc bụng	0	không bạc bụng
	1	vết đục ít hơn 10% trong hạt gạo
	5	trung bình (11% đến 20%)
	9	nhiều (hơn 20%)
Dài hạt gạo	1	rất dài (hơn 7,5mm)
	3	dài (6,6 đến 7,5 mm)
	5	trung bình (5,51 đến 6,6 mm)
	7	ngắn (5,5mm hoặc ngắn hơn)
Dạng hạt (D/R)	1	thon dài (D/R lớn hơn 3)
	3	trung bình (D/R=2,1 - 3,0)
	5	bầu (D/R= 1,1 - 2,0)
	9	tròn (D/R ít hơn 1,1)
Mùi thơm	0	không thơm
	1	hơi thơm

Amylose	2	thơm
	0-2%	nếp
	2-20%	thấp (gạo dẻo)
	20-25%	trung bình (mềm cơm)
	>25%	cao (cứng cơm)
Độ trở hồ	1	cao (hạt gạo còn nguyên)
	2	cao (hạt gạo phồng lên)
	3	cao (phồng lên, viên còn nguyên, nở ít)
	4	trung bình (phồng lên, viên còn nguyên, nở
	5	trung bình (hạt rã ra, viên hoàn toàn nở
rộng) rộng)	6	thấp (hạt tan ra hoà chung với viên)
	7	thấp (hạt tan ra hoàn toàn và trong)
	1	80 -100mm mềm
	3	61 - 80mm mềm
	5	41 - 60mm trung bình
Độ bền thể gel	7	36 - 40mm cứng
	9	ít hơn 35mm cứng

Thanh lọc bệnh và rầy nâu theo phương pháp hộp mạ của IRRI , song song bên cạnh đó xác định bằng marker để đánh giá gen kháng bệnh đạo ôn và rầy nâu .

Bảng1 Môi trường cơ bản trong nuôi cấy

TT	Thành phần	MS(mg/l)	N6(mg/l)
1	Muối khoáng		
2	Amonium nitrat		
3	Amonium sulfat		
4	Boric acid		
5	Calcium chloride		
6	Cobalt chloride 6H ₂ O	0.025	
7	Cupic sulfat. 5H ₂ O	0,025	
8	Ethylene diamine tetraacetit acid , 2naH ₂ O	37.26	37.26
9	Ferrous sulfate. 7H ₂ O	27.8	27.8
10	Magiesium sulfat	180.7	90.35
11	Manganese sulfat	16.9	3.33
12	Molybdic acid (Na ₂ .H ₂ O	0.25	
13	Potassium iodide	0.83	0.8
14	Monobase potassium phosphate		400.0
15	Potassium nitrat	1900.0	2830.0
16	Zinc sulfate.7 H ₂ O	8.6	1.5
17	Các chất hữu cơ và vitamine		
18	Glycine	2.0	2.0
19	Thiamine HCl	0.4	1.0
20	Myo Inositol	100.0	100.0
21	Pyridocine HCl	0.5	0.5
22	Nicotinic acide	0.5	0.5

	Các chất kích thích sinh trưởng		
23	2,4 D	0.5	0.5
24	Napthalene acetic acid	1.0	1.0
25	Belzyl amino purin	0.5	0.5
26	Glucose	60	60
27	Agar	8.0	8.0
28	PH	5.8	5.8

3. Phương pháp đánh dấu marker phân tử

- Sử dụng đánh giá 10 microsatellite marker có tính đa hình cao để điều tra bước đầu

Các bước tiến hành

- Ly trích DNA

Phân tử DNA phục vụ cho yêu cầu phân tích PCR được chuẩn bị theo qui trình simplified miniscale. Một mẫu lá tươi, non (2 cm) được thu và đặt trong ống nghiệm ly tâm 1,5ml có đánh dấu, trong đá lạnh. Lá được nghiền trong cối và chày (Spot Test Plate -Thomas Scientific) sau khi đã thêm vào 400 μ l dung dịch đệm (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 25mM EDTA, 300mM NaCl and 1% SDS). Nghiền mẫu đến khi dung dịch đệm có màu xanh lá cây. Thêm 400 μ l dung dịch đệm rồi trộn đều. Chuyển 400 μ l lysate vào ống nghiệm có mẫu lá ban đầu. Lysate sẽ kích hoạt phản ứng tách protein nhờ cho vào 400 μ l chloroform. Vật thể nổi (supernatant) được chuyển vào ống nghiệm mới (1.5 ml) và DNA được kết tụ nhờ sử dụng cồn ethanol. Mẫu DNA được làm khô nhờ gió và ngưng kết trong 50 μ l dung dịch đệm TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0). Chúng tôi sử dụng aliquot 1 μ l cho phân tích PCR. Mẫu DNA được tồn trữ trong tủ lạnh sâu -20°C để sử dụng.

Xét nghiệm microsatellite

Khuếch đại PCR được thực hiện trong 10mM Tris-HCL (pH 8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂.1 đơn vị của TAKARA *Taq*, 4 nmol dNTP, 10pmol primer và 50ng genomic DNA. Chu kỳ PCR: tách dây đôi ở 95°C trong 5 phút, theo sau là 35 chu kỳ 94°C trong 60 giây, 55°C trong 30 giây và 72°C trong 60 giây. Quá trình kéo dài dây sau cùng là 72°C trong 5 phút. Cho thêm vào 13 μ l dung dịch đệm (98% formamide, 10mm EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol) sau khi PCR. Đa hình trong sản phẩm PCR được phát hiện nhờ thuốc nhuộm ethidium bromide sau khi điện di trên 5% agarose gel.

Phương pháp STS marker

Các bước tiến hành như sau:

1. Các thành phần dung dịch dùng thường đặt trong tủ lạnh -20 °C hoặc -80°C
2. Ghi nhãn cẩn thận trên ống nghiệm 0,5 μ l hoặc trên micro tap (một loại đặc biệt dùng để chạy mẫu PCR)
3. Chuyển 10,0 μ l của mẫu DNA vào ống nghiệm
4. Chuẩn bị pha dung dịch

Thành phần	Pha nồng độ	Phản ứng cho nồng độ	μl/mẫu
Nước cất			4,9
PCR buffer	10X	1x	2.0
dNTP	4mM	200uM	1,0
Primer Forward	5uM	250nM	1,0
Primer reverse	5uM	250nM	1,0
Taq polymerase	5U/μl	0,5U	0,1
			10.0μl

5. Trộn đều và ly tâm

6. Dùng pipette lấy 10.0μl cho mỗi phản ứng trong ống nghiệm có chứa sẵn DNA

7. Lấy một giọt dầu (mineral oil) phủ trên dung dịch

8. Ly tâm

9. Đặt ống nghiệm vào máy PCR, đóng nắp máy và khởi hành cho máy hoạt động

10. Chu trình hoạt động của máy như sau:

Chương trình	Kiểu	Giai đoạn 1		Gđoạn 2		G.Đoạn 3		Số chu kỳ
		Nhiệt độ	Thời gian	Nhiệt độ	Thời gian	Nhiệt độ	Thời gian	
1		94°C	5 phút					
2	Chu kỳ	94°C	30 giây	55°C	30 giây	72°C	1phút	30
3		72°C	5 phút					
4		4°C						

11. Lấy mẫu ra khỏi máy, khi hoàn thành chu kỳ

12. Dự trữ nhiệt độ 4°C

13. Phân tích mẫu trên agarose gel

Phương pháp SSR

Thành phần	Pha dung dịch	Thể tích	Nồng độ sau cùng	Ghi chú
H ₂ O		12,5		
PCR buffer	10X	2	1X	
DNTP	1mM	2	100uM	
Primer Forward	5uM	4	0,25uM	
Primer reverse	5uM	5	0,25uM	
Taq polymerase	5unit/μl	0,5	2,5 unit/20μl	
DNA	25ng/μl	1	25ng/μl	Tùy theo nồng độ DNA

Chu trình hoạt động của máy như sau:

	Kiểu	Giai đoạn 1	Giai đoạn 2	Giai đoạn 3	
--	------	-------------	-------------	-------------	--

Chương trình	Kiểu	Giai đoạn 1		Giai đoạn 2		Giai đoạn 3		Số chu kỳ
1		Nhiệt	Thời	Nhiệt	Thời	Nhiệt	Thời	
2	Chu kỳ	94°C	1 phút	55°C	1 phút	72°C	2 phút	35
3		72°C	5 phút					
4		4°C						

Điện di trên agarose gel

1. Chuẩn bị dung dịch 1X TAE, đổ 1X TAE vào khay của điện di
2. Pha dung dịch agarose 1.5%. Tùy thuộc vào kích thước của khay chứa điện di.
3. Đun sôi dung dịch agarose trên lò sóng vi ba.
4. Làm lạnh agarose ở nhiệt độ 55°C trước khi đổ gel vào khay.
Đặt sản phẩm PCR và cho gel chạy.
5. Sau khi gel cứng, di chuyển lược ra khỏi gel
6. Đặt khay gel vào bể điện di. Chú ý nhẹ tay, tránh bọt khí
7. Lấy 1 đoạn parafilm, đặt lên 2µl 10X loading buffer. Cộng thêm 8µl PCR products và trộn chúng cho tốt. Dùng pipetteman hút DNA và đặt vào giữa giếng.
8. Mở điện và định thời gian cho gel chạy
9. Chấm dứt thời gian chạy điện di (3-4 giờ). Tắt điện

Mang gel chụp ảnh dưới tia UV

Giống như các phương pháp phân tích RAPD, STS. Agarose được nấu cho tan, với nồng độ 3%. Tùy theo thể tích của khung điện di mà tính toán số lượng agarose cho phù hợp.

Điện di trên acrylamid gel

Chuẩn bị kính để chạy gel

1. Rửa kính thật sạch qua nước và nước rửa với giấy mềm hoặc bọt biển, đặt kính đứng để mau khô.
2. Đối với kính dài: mang bao tay để rửa. Rửa 3 lần với cồn 95° và dùng giấy kimwipes. Trộn 1% cồn, 5µl acid glacial acetic, 3µl bind silane.
3. Dùng pipet man lấy 1ml dung dịch bind silane đặt nhẹ trên kính, chú ý phải phủ đều dung dịch này trên kính.
4. Lấy giấy Kimwipe lau sạch
5. Sau 5-10 phút phơi khô và rửa cồn 95%. Lặp lại giai đoạn này 2-3 lần
6. Đối với kính ngắn: Thay bao tay trước khi rửa, dùng pipetman, lấy 1ml SigmaCode đặt phủ trên toàn tấm kính,
7. Sau 5-10 phút dùng cồn 95° rửa tiếp với kimwipes. Chuẩn bị khung kính, đặt kính ngắn trên bàn, lấy hai dây đặt hai đầu

Đổ gel polyacrylamide

1. Chuẩn bị 5% acrylamine gel trong 100ml trước khi đổ gel
2. Thêm 50µl TEMED và 600µl 10% ASP(ammonium persulfaate)

3. Nhẹ nhàng đưa gel vào khung bằng cách dùng ống bơm. Chú ý tránh bọt khí

Sau khi đưa gel vào khung, đặt lược vào. Kéo đến dùng giấy plastic phủ các đầu gel. Tránh làm khô gel.

4. Sau hai giờ chúng ta có thể tiến hành loading

Chạy acrylamide gel

1/ Đổ 500ml 1xTBE vào phòng trên tạo dung dịch đệm trong bể

2. Tiếp tục đổ 500ml 1X TBE vào phòng dưới

3. Nối điện và cho chạy. Khởi động ban đầu 2500V, 150 mA và 90W. Giai đoạn này chạy nóng khoảng 30 phút, trước khi loading.

Loading

1. 10µl loading thêm vào mỗi probe (8µl thể tích từ phản ứng PCR)

2. Đặt mẫu vào đá ngay tức khắc sau khi denature

5. Tắt điện và chuẩn bị loading

6. Ghi nhãn cẩn thận

7. Rửa các giếng cẩn thận

8. Loading : 10 µl mẫu đưa vào giếng

9. Khởi động máy trở lại với 2500volt ,120 mA và 70 W. Sau khi loading mẫu đầu tiên khoảng 30 phút, tiếp tục loading mẫu thứ hai và trên một gel có thể loading 4 set

10. Khi gel đạt hoàn toàn, thời gian có thể thay đổi tùy theo loading chậm hay nhanh, tắt điện và di chuyển gel ra ngoài. Chú ý mở buồng trên và đổ buffer vào một cal nhựa để dành cho gel đợt sau.

11. Di chuyển gel ra khỏi tấm kính

12. Mở ốc vặn, một tay nâng kính ngăn, ngón tay trở nâng từ từ tấm kính dài và tách khỏi tấm kính ngắn.

13. Gel nằm và dính chặt trên tấm kính dài

Rửa phim

1. Gel nằm và dính chặt trên tấm kính dài .

2. Đặt kính và gel vào bể có chứa 10% acid acetic (dung dịch này gọi là dung dịch cố định (thời gian 20-25 phút). Dung dịch này giữ lại để dùng trong giai đoạn 7

3. Rửa nước (hai lần trong 2 phút)

4. Nhuộm dung dịch bạc (30 phút) cho lần nhuộm thứ nhất. Thời gian nhuộm lần thứ hai 45 phút và nhuộm lần ba 60 phút.

5. Rửa gel (rất nhanh 20 giây)

6. Rửa phim : Giai đoạn này nhanh hay mau tùy theo phản ứng

7. Đưa sang dung dịch cố định phim

8. Rửa nước
9. Phơi khô
10. Đếm band

- Phân tích sự ổn định theo mô hình Eberhart và Russel (1966) và được bổ sung bởi chương trình phân tích GxE theo BSTAT

I. $Y_{ij} = \mu_i + \beta I_j + \delta_{ij}$

$$I_j = (\sum Y_{ij} / V) - (\sum \sum Y_{ij} / vn)$$

Y_{ij} = trung bình của giống I ở môi trường j

μ = Giá trị trung bình tổng thể của các giống qua tất cả các môi trường

β = Hệ số hồi quy của giống thứ I trên chỉ số môi trường, tham số để đo lường phản ứng của giống đối với sự thay đổi môi trường.

I_j = chỉ số môi trường.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

III.1 khai thác vật liệu di truyền phục vụ cho nuôi cấy tế bào soma và tái phân

Một số tổ hợp được quan sát trên quần thể F2 với hai thông số hệ số di truyền (H) và phương sai kiểu gen (sg^2) trên hàm lượng amylose, tỉ lệ protein, độ bền thể gel (GC) và độ trở hồ (GT). Kết quả ghi nhận trên (bảng 1) cho thấy hàm lượng amylose của các tổ hợp cho thấy cao. Chứng tỏ rằng amylose được kiểm soát chủ yếu do di truyền bên trong. Giá trị hệ số di truyền thấp trên các tính trạng độ bền gel, độ trở hồ. Một vài tổ hợp ghi nhận trên tỉ lệ protein có hệ số di truyền thấp. Điều này cho thấy các chỉ tiêu trên có sự tương tác kiểu gen và môi trường (GxE). Qua kết quả giúp cho chúng ta chọn vật liệu ban đầu cho tốt để khai thác các tính trạng mong muốn thông qua nuôi cấy bao phấn._

Bảng 1: hệ số di truyền và phương sai của vài tổ hợp, phân tích quần thể F2

Cặp lai	Amylose		GC		GT		Protein	
	sg^2	H	sg^2	H	sg^2	H	sg^2	H
1	1,20**	0,76	0,01	0,10	0,01	0,12	0,06	0,23
2	1,23*	0,84	0,05	0,20	0,01	0,40	0,04	0,13
3	0,8**	0,75	0,07	0,28	0,02	0,45	0,12*	0,36
4	1,2*	0,83	0,12*	0,32	0,30*	0,62	0,10*	0,32

Chuẩn yù : 1: IR 64/ Jamine, 2: IR 64/ KhaoDawMali105; 3: OM 1490 / Nàng thơm chợ đào, 4/OMCS 2000/ KhaodawMali 105

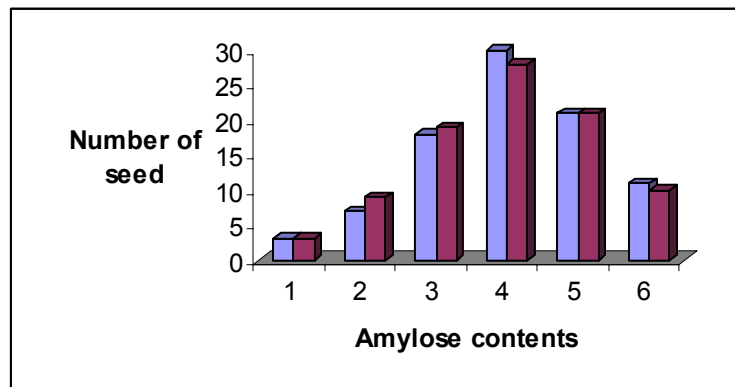
*, **, Có ý nghĩa mức 0,05 và 0,01 theo thứ tự

Có một điều đánh chú ý khai thác các thể hệ con lai

Nghiên cứu chất lượng của lúa gạo là tính trạng rất phức tạp với nhiều thành phần khác nhau như chất lượng dinh dưỡng, chất lượng cơm, chất lượng mùi vị khi ăn cơm. Mỗi thành phần có giá trị quyết định bởi tính trạng về vật lý và tính chất hoá học thông qua lịch sử điều kiện canh tác cũng như thị hiếu tiêu thụ của mỗi người. Một vài trở ngại trên một vài giống lúa cao sản không ngon cơm do hàm lượng amylose kiểm soát. Đối với giống lúa địa phương phần lớn có phẩm chất ngon cơm như KhaodawMali 105, Nàng thơm chợ Đào, Nàng nhen, Nàng Hương vv. do góp phần một phần hàm lượng amylose và độ bền gel cũng như độ trở hồ. Chất lượng cơm của các giống lúa liên quan với ba tính trạng trên và ba tính trạng này có tính chất hoá lý của giống lúa liên quan với tinh bột

trong phôi nhũ : tên là amylose (AC) độ bền gel (gel consistency) và độ trở hồ (GT) gelatinization temperature (GT) . Một số nghiên cứu di truyền trên hàm lượng amylose trên phôi nhũ , nếu hàm lượng amylose cao sẽ cứng cơm hoặc ngược lại . Phân tích bằng phân tử cho thấy rằng gen *Wx* có tương quan với hàm lượng amylose

Kiểu gen AC : trên hai quần thể F₂ và BC₂F₂ được chuyển AC từ bố mẹ vào con lai với quần thể F₂ và BC₂F₂ . Sự phân ly của F₂ và BC₂F₂ đều theo tỉ lệ 3:1 . Sự phân ly của AC được kiểm soát theo định luật Mendel với quần thể allelen có AC cao cho gen trội . Sự phân ly và chuyển vị của các allele khác nhau trên hai quần thể F₂ và BC₂F₂ trên hình 1



Hình 1: Hàm lượng amylose của F₂ và BC₂F₂ của tổ hợp lai IR 64/ Jasmine 85

Kiểu gen của GC : độ bền gel trên quần thể chia ra cứng và mềm rõ nét trên quần thể BC₂ và F₂ phân theo tỉ lệ 1:2:1 trên (bảng 2)

Kiểu gen của GT: Đối với GT khi phân tích quần thể F₂ sẽ cho tỉ lệ phân ly theo tỉ lệ 1:3 , tuy nhiên khi phân tích quần thể BC₂F₂ thì tỉ lệ phân ly theo tỉ lệ 1:1 .Điều này cũng phù hợp với nhiều tác giả trước đây

Bảng 2 : Các thông số di truyền trên các tính trạng AC, GC và GT trên tổ hợp IR64/ Jasmine 85 :

Tính trạng	Quần thể	Số cây	Số cây	Số cây	Tỉ lệ	X ²
AC	F ₂	62(>21%)	28(<21%)		3:1	0.54
	BC ₂ F ₂	60(>21%)	30(<21%)		3:1	0.50
GC	F ₂	25(>60mm)	50(>50mm)	26(<40mm)	1:2:1	0.64
	BC ₂ F ₂	21(>60mm)	44(>50mm)	26(<40mm)	1:2:1	0.60
GT	F ₂	25(>6)	70(<3mm)		1:3	0.46
	BC ₂ F ₂	42(>6)	49(<3mm)		1:1	0.14

Kết luận ba tính trạng AC, GC và GT xem như là tính trạng rất quan trọng trong chất lượng của gạo . Kết quả của báo cáo này phân tích rất rõ khi xem xét trên IR64/ Jasmine 85

Phân tích sự tương quan của ba tính trạng liên quan phẩm chất cơm

Phân tích hệ tương quan cả hai quần thể F_2 và BC_2F_2 trên các tính trạng : AC, GC, GT cho thấy giữa AC và GT cả hai có tương quan rất chặt cả F_2 và BC_2F_2 (bảng 3) . Đối với quần thể F_2 tương quan của hai chỉ tiêu này rất lý thú nếu kết hợp hai tính trạng trên sẽ cho con lai vừa ngon cơm và dẻo . Tuy nhiên trong BC_2F_2 tương quan có chiều ngược lại bất lợi khi xử dụng các giống trong quần thể con lai đối với các hạt gạo ngon cơm nhưng lại cứng cơm .

Bảng 3: Hệ tương qua của các tính trạng với AC với GC và GT trên hai quần thể F_2 và BC_2F_2 của IR64/Jasmine 85

Tính trạng	AC
GT: F_2 : BC_2F_2	-0,7488** 0,7739**
GC : F_2 : BC_2F_2	-0,171 -0,149

Tuy nhiên khi phân tích hệ tương quan kiểu gen(r_g), kiểu hình(r_p) và môi trường (r_e) cho các thông số như sau trên quần thể F_3 của IR64/ Jasmine 85 như bảng 4 : AC tương quan r_g , r_p và r_e rất chặt với GC và có ý nghĩa thống kê mức 0,05 và 0,01 theo thực tự . Tuy nhiên độ bền gel và protein thì chỉ có ý nghĩa với môi trường r_e . Tương quan giữa GT và GC cũng chỉ ghi nhận tương quan âm ở môi trường . Điều này cũng khẳng định rằng hai tính trạng AC và CT có tương quan rất chặt với kiểu gen, kiểu hình và môi trường .

Bảng 4: hệ tương qua kiểu gen(r_g), kiểu hình(r_p) và môi trường (r_e) trên quần thể F_3 của IR 64/ Jasmine 85

Tính trạng	Hệ tương quan	GC	GT	Protein
AC	r_g	0,331*	0,151	0,120
	r_p	0,472**	-0,212	0,232
	r_e	0,510**	-0,380*	0,415*
GC	r_g		0,118	0,235
	r_p		-0,256	0,317
	r_e		-0,342*	0,461*
GT	r_g			-0,037
	r_p			0,158
	r_e			0,269

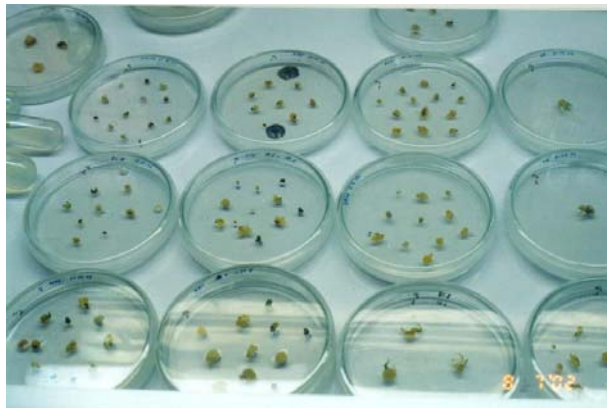
III.2.Khai thác tế bào soma

12 giống lúa được ứng dụng và khai thác tế bào soma, tuy nhiên theo dõi các giống cho tỉ lệ tái sinh tốt có 4 giống (bảng 3). Hầu hết các giống phát triển mô sẹo khoẻ mạnh trong 3 tuần ủ. Các giống khác nhau thì tỉ lệ thành lập mô sẹo cũng khác nhau, đồng thời khả năng phát triển của các mô sẹo cũng khác nhau. tỉ lệ thành lập mô sẹo cao nhất là Nàng thơm Chợ đào (86,67%) có mô sẹo phát triển tốt , kế đến là Jasmine (70,42%), OM 1490 (63,33%), mô sẹo cũng phát triển tốt có thể dùng làm nguồn vật liệu nuôi cấy mô tế bào

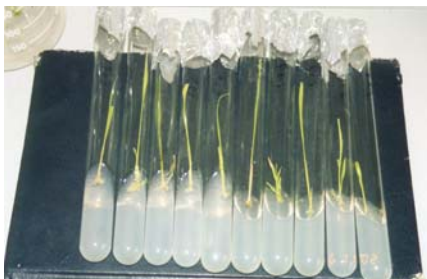
để tạo biến dị di truyền. Các giống cho dòng tái sinh cao là Nàng thơm chợ đào, kế đến là Jamine. tuy nhiên số dòng được chọn để đưa qua so sánh năng suất và phẩm chất thì tỉ lệ giống Nàng thơm chợ đào và OM 3536 cho kết quả tốt nhất (bảng 5).

Bảng 5: kết quả tạo tế bào soma trên vài giống

Giống	Số hạt	% mô sẹo	% cây tái sinh	Số dòng tái sinh	Số dòng SC 2 được chọn
OM 1490	125	63,33	50,2	71	12
OM 3536	142	55,33	45,1	51	40
Nàng thơm chợ đào	127	86,67	70,0	210	51
Jamine	125	70,42	61,2	100	20



Hình 2: khai thác biên dị soma của các giống lúa đặc sản



Hình 3: Cây lúa chuyển sang môi trường tái sinh

III.3. Chọn lọc giống phẩm chất thông qua nuôi cấy túi phấn

Nuôi cấy túi phần là phương pháp chung để tạo cây có tế bào đơn bội. Với phương pháp này giúp chọn ra nhiều dòng mới với cải tiến tính trạng nông học của giống này. Trong bài báo cáo này chúng tôi nghiên cứu cấy túi phần để cải tiến phẩm chất trên các giống lúa, tập trung các tính trạng chính: Phẩm chất cơm và phẩm chất dinh dưỡng của hạt gạo

Nuôi cấy túi phần trong thế hệ F1 và F2 của cây lúa để tạo quần thể tế bào đơn bội và đơn bội kép kiểm soát bởi các yếu tố tham gia như môi trường nuôi cấy, điều kiện tối (Hình 4). Việc nuôi cấy phần thành tựu thuộc vào cặp lai của



Hình 4: Túi phần được đưa ra môi trường nuôi cấy

Tùng tổ hợp. Tùy theo từng giống có thể từ 4 đến 8 tuần thì mô sẹo xuất hiện. Phần trăm mô sẹo xuất hiện được đánh giá tùy thuộc vào phần trăm của túi phần sản xuất ra callus. Khi callus dài 2 mm, sẽ được chuyển sang môi trường tái sinh. để đảm bảo phần trăm tái sinh, đếm số callus từ túi phần tạo ra cây xanh và cả cây bạch tạng trên 100 túi phần được phân lập. Nhân cây tái sinh từ một callus tạo ra được trồng ra ngoài đất và cho cây phát triển.

Tổng số 1000 tới 7000 túi phần được lặp lại và đánh giá qua 4 lần lặp lại trên môi trường

N6. ảnh hưởng của số túi phần trên các tổ hợp lai được đánh giá môi trường tạo mô sẹo.

Tỷ lệ rất thấp trên các giống indica/indica. Trên bảng 6 rilen các giống lai từ Japonica/ indica cho thấy tỷ lệ mô sẹo có khá hơn từ 1,39 đến 1,67%.

Bảng 6: ảnh hưởng chuyển túi phần từ môi trường mô sẹo sang môi trường tái sinh

STT	Tổ hợp lai	Số bao phần cấy	Tỷ lệ tạo callus
1	IR64 / OMCS4	720	0.27
2	IR64 / OM CS96	360	0.56
3	IR64 / DS20	240	0.42
4	IR64 / Jamine 85	240	0.42
5	OM 1490 / IR64	1320	0.3
6	IR64/ OM 2536	240	0.42
7	OM 1490 / KhawDawMali 105	600	0.33

9	OM 1490 / Jamine 85	240	0.83
10	JASMINE / KHAODawMali 105	120	0.83
11	OM 1490 / Nàng Thơm Chợ Đào	360	0.56
12	CS2000 / KHAO DAW Mali 105	360	1.11
13	OMCS 2000/ Jamine 85	240	0.42
14	Tequing/KhaodawMali 105	480	1.67
15	Tequing/Nàng thơm Chợ đào	360	1.39
16	Tequing/Jamine 85	240	1.25
17	Tequing/ OM 3536	360	1.39

Từ mô sẹo chuyển sang môi trường tái sinh cho tỉ lệ cao tới 64,52% (OMCS2000/KhaoDawMali 105) hình 4 . Tuy nhiên cũng có nhiều cặp lai không cho thấy tỉ lệ tái sinh như IR64/OMCS96 hoặc Jamine/ OMCS2000 vv....Cây tái sinh từ môi trường nuôi cấy túi phần cho thấy tổ hợp cho tỉ lệ cây xanh là 6,1% trên cặp lai OMCS2000/ KhaodawMali 105 và DS20/ Nàng thơm Chợ Đào (5,0%).

Cây mô lúa nhằm mục đích là sản xuất cây đơn bội hoặc cây lưỡng bội kép thông qua sự nhân đôi nhiễm sắc thể ở mô sẹo đơn bội từ cây túi phần. Các biến dị thường gặp và được biết thông qua nuôi cấy túi phần. Biến dị này tạo cây phát triển không bình thường như bạch tạng, cây méo mó, lùn vv.. . Do đó gia tăng biến dị của giống cây trồng cũng là một phần quan trọng trong công tác cải tiến cây lúa . Cấu trúc tế bào của lá cây bạch tạng cho thấy không có ribosome. Do đó quá trình sinh tổng hợp protein của cây bạch tạng không hoàn toàn dẫn đến tình trạng không màu trên cây và lá và không thành lập các tiền lục lạp .

Khi nuôi cấy cây hai lá mầm, hiện tượng chuyển trực tiếp từ tiểu bào tử nên ít thấy xuất hiện cây bạch tạng . Đối với cây một lá mầm như lúa , cây hoàn chỉnh và phát triển phải qua giai đoạn mô sẹo thì tỉ lệ bạch tạng chiếm tỉ lệ khá cao , tỉ lệ này có khi lên đến 50- 80% .Điều này phù hợp với các báo cáo(Lee và ctv 2003) Trường hợp này dẫn đến cây tái sinh rất thấp như tổ hợp OMCS2000/Nàng thơm Chợ đào tỉ lệ bạch tạng chiếm 66,65% trên bảng 5 . Điều này cũng phù hợp cho một số tổ hợp giàu vitamine A chiếm 85% cây bạch tạng trong tổ hợp OM 4392/ Jamine (bảng 7)

Bảng 7: Tỉ lệ cây tái sinh trên vài tổ hợp

STT	Tổ hợp lai	Số callus cây	Tỷ lệ callus tái sinh cây xanh (%)	Tỷ lệ callus hình thành cây bạch tạng (%)	Số cây xanh đưa ra chậu vại	Tỷ lệ cây xanh so với số bao phần cây (%)
1	IR64 / OM CS96	2	0	16.67	0	0

2	IR64 / OM 1490	2	0	50	0	0
3	DS20 / Nàng thơm chợ đào	2	50	0	18	5
4	OM 1490/Jamine	8	12.5	0	24	5
5	OMCS2000/ Khao DawMali 105	5	20	0	22	6.1
6	OMCS2000/ Nàng thơm chợ đào	3	0	66.67	0	0
7	IR 64/ Nàng thơm chợ đào	3	33.33	16.7	10	2.08
8	Jamine/ OMCS2000	2	0	0	0	0
9	OMCS 2000/ KhaoDawMali 105	31	64.52	0	28	1.94

Một số thông tin khi phân tích các tổ hợp lai để khai thác hàm lượng **giàu** vitamine như sau : Đối với tổ hợp khai thác từ giống OM 4393 có tỉ lệ mô **sẹo** rất cao . Có điều ngạc nhiên tỉ lệ túi phần cho cây rất cao ở tổ hợp OM 4392/ OM 3536

Hình 5: Môi trường mô sẹo (bên cạnh có những túi phần không phát triển)

Bảng 8 : Đánh giá tỉ lệ mô sẹo và phát triển cây tái sinh trên tổ hợp giống giàu vitamine

Cặp lai	Số túi phần	Phần trăm mô sẹo (%)	Số mô sẹo /đĩa	Phần trăm cây xanh (%)	Phần trăm cây sản xuất ra nhà lưới	Phần trăm cây bạch tạng (%)	Tỉ lệ túi phần / cây (%)
OM 4392/ OM 1490	480	92.00	64	3.12	17.81	48.43	9.09

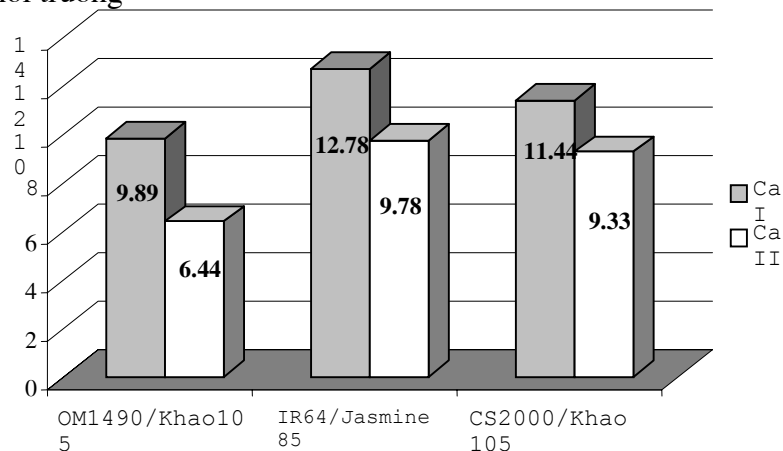
OM 4392/ OM 3536	678	86.70	192	18.23	43.75	75.0	39.15
OM 4392/ OM 2031	491	47.49	113	1.50	0.98	53.58	1.50
OM 4392/ Jasmin 85	500	54	53	0.75	0.5	85.0	1.25

III.3.3. Khả năng tạo mô sẹo trên một số môi trường

Việc thành công hay thất bại trong việc nuôi cấy mô công nghệ tùy thuộc vào môi trường, do vậy khi quan sát sự tạo mô sẹo của các tổ hợp lai trên các môi trường, CaI (tạo mô sẹo 1) và CaII (tạo mô sẹo 2), kết quả ở bảng 6 cho thấy trên hầu hết các tổ hợp lai đều có thể tạo mô sẹo trên hai môi trường khi cấy từ yểu phẩn. Tuy nhiên, khả năng tạo mô sẹo giữa các tổ hợp lai trên cùng môi trường có sự khác biệt, tổ hợp lai IR64/Jasmine 85 có tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất 12,78% so với các tổ hợp khác. Mặt khác, trên hai môi trường khảo sát, môi trường CaI ($N_6+2 \text{ mg.L}^{-1}2,4D + 1 \text{ mg.L}^{-1}NAA$) có tỷ lệ tạo mô sẹo trung bình 11,37% cao hơn môi trường CaII ($N_6+2 \text{ mg.L}^{-1}2,4D$) có tỷ lệ 8,52% (hình 6,7).

Bảng 9. tỷ lệ tạo mô sẹo trên các môi trường

Tổ hợp	tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	
	Ca I	Ca II
OM1490/Khao10 5	9,89c	6,44c
IR64/Jasmine85	12,78a	9,78a
CS2000/Khao 105	11,44b	9,33b
TB	11,37	8,52
CV%	11,88	20,86
LSD_{0.05}	1,32	1,37



Hình 6: Mô sẹo hình thành trên môi trường CaI và CaII

III.3.4 Đánh giá sự tái sinh c và các loại môi trường

Khi mô phôi sinh đầu tiên được thiết lập và đưa vào môi trường lỏng. Tế bào non sẽ hiện diện. Những tế bào này xuất hiện khi đầu tiên khi chọn vật liệu hoặc do phôi sinh. Một vài tế bào sẽ sản xuất ra polysaccharides, tế bào không thành phôi cũng xuất hiện sẽ cùng nhau xuất hiện tạo một dung dịch huyền phù. Đặc biệt phải quan sát đầu tiên (xem trực tiếp trong môi trường lỏng).

Lúc này phải chuyển qua môi trường mới. Phôi và phôi sinh nếu hiện diện, sẽ xuất hiện màu vàng và nâu lơ lửng dưới kính hiển vi. Sau đó trở nên đen sau vài ngày. Phôi sinh sẽ khởi hành đời sống ban đầu và phát triển sẽ xuất hiện màu vàng tới tím nhạt. Một số phôi khởi đầu xuất hiện ngay tức khắc. Có thể để 4 tuần cho mô sống trong môi trường

lông. Nếu quan sát dưới kính hiển vi một số mô màu đen thì các mô sẽ không phát triển.

Cây con có thể tạo trực tiếp từ phôi đơn tính đực mà không cần chuyển. Trường hợp các phôi cần phải chuyển sang môi trường mới gọi là môi trường tái sinh. Mỗi loại cây sẽ có môi trường tái sinh khác nhau. Thí dụ cây lúa môi trường tái sinh cần lượng đường thấp 20- 30 gram/ lit và 2,4-D được thay bằng NAA, hoặc IBA. Môi trường cơ bản vẫn MS với 4mg/lit kinetin và 0,5 mg/lit IAA. Trong kết quả nghiên cứu này cho thấy rằng mô sẹo sau khi hình thành trên các môi trường 5 tuần được chuyển sang 4 loại môi trường tái sinh, Ge I (tái sinh 1), GeII (tái sinh 2), GeIII (tái sinh 3) và GeIV (tái sinh 4). Khi khảo sát sự tái sinh cây xanh trên bốn loại môi trường, hầu hết các tế bào có khả năng tái sinh nhưng sự tạo mô sẹo từ túi phần có sự khác biệt giữa các tổ hợp lai. Tất cả các tổ hợp có sự thích nghi trên hai loại môi trường GeI và GeII. Tuy nhiên khi so sánh trong cùng nhóm môi trường và trên cùng tổ hợp lai, kết quả bảng 3 cho thấy tổ hợp IR64/Jasmine85 có khả năng tái sinh cao nhất trên môi trường GeII (MS+1mg. l⁻¹ Kinetin + 0,5mg.l⁻¹ NAA+ 2mg. l⁻¹ BA), các tổ hợp lai khác cũng có khả năng tái sinh nhưng tỉ lệ tạo cây xanh thấp hơn. (bảng 9)

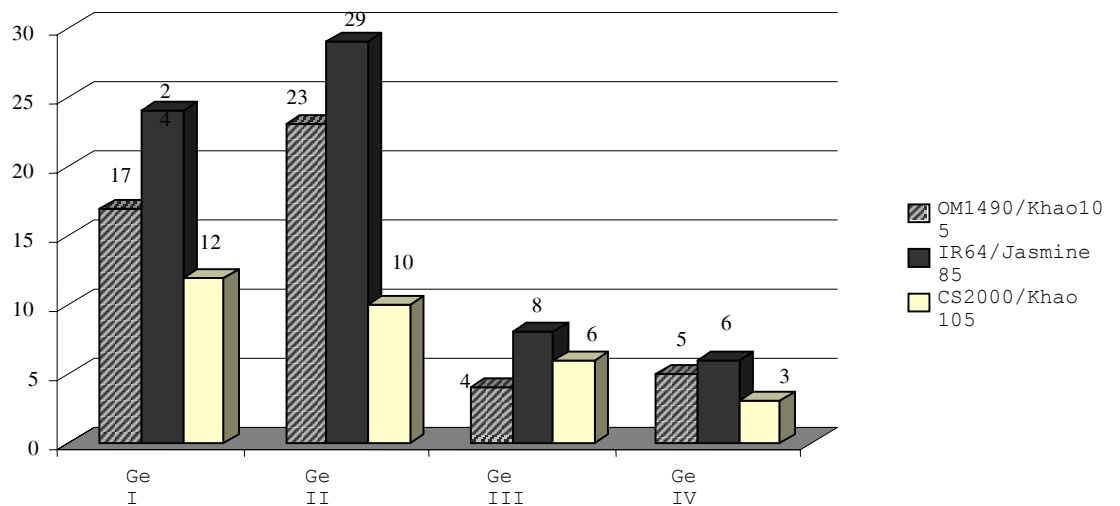
Bảng 9. Khả năng tái sinh cây xanh trên các môi trường

Tổ hợp	Số cây xanh tái sinh							
	Ge I	Ge II	Ge III	Ge IV	CV%	LSD _{0,05}	T _{ống}	TB
OM1490/Khao105	17 A a	23 AB a	4 A b	5 A b 12,25	89,48	1,173	49,00	
IR64/Jasmine85	24 A ab	29 A a	8 A bc	6 A c 16,75	108,34	1,942	67,00	
CS2000/Khao 105	12 A a	10 B a	6 A a	3 A a 7,75	122,08	1,119	31,00	
CV%	119,16	104,81	106,6	122,08				
LSD _{0,05}	2,19	2,05	0,69	0,62				
T _{ống}	53,00	62,00	18,00	14,00				
TB	17,67	20,67	6,00	4,67				

Ghi chú: A, so sánh các tổ hợp lai trên cùng một môi trường

a, so sánh các môi trường trên cùng tổ hợp lai

Sầu cây



Hình 7: cây tái sinh trên các môi trường

Ngoài ra, khi cây xanh đạt kích thước khoảng 1.5-2cm có thể tách ra cho nhân chồi trên môi trường MS bổ sung 2mg/L^{-1} BA hay chuyển sang môi trường tạo rễ Rt ($\text{MS} + 0,5\text{mg.l}^{-1}$ NAA), khi rễ có chiều dài 2-3 cm các cây được chuyển sang môi trường dinh dưỡng, Yoshida, để chuẩn bị cho ra nhà lưới. Trên hầu hết các chồi được tách ra và nhân số lượng trên môi trường nhân chồi đều tạo chồi tốt, nhưng các chồi

được tạo ra có thân lá hoàn chỉnh, có thể chuyển sang môi trường tạo rễ sau 20-30 ngày (Hình 8)



Hình 8: Cây môi trường tái sinh

Trong quá trình tái sinh cây từ túi phần, hiện tượng cây tái sinh không tổng hợp được diệp lục tố, nên cây có màu trắng còn gọi là cây bạch tạng. Điều này khác với quá trình tạo đột biến bằng tế bào soma. Trên tổ hợp nuôi cấy túi phần cây bạch tạng đạt tỉ lệ cao nhất trên tổ hợp lai OM1490/Khao105 (60,98%), thấp nhất trên tổ hợp CS2000/Khao105 (42,42%) và khác biệt ở mức ý nghĩa 0.05. Tuy nhiên, khi đánh giá chung số lượng cây tái sinh giữa các tổ hợp, tổ hợp IR64/Jasmine85 có số lượng cây tái sinh

cao (67 cây, bảng 8) trên môi trường GeII (MS+1mg. l⁻¹ Kinetin + 0,5mg.l⁻¹ NAA+ 2mg. l⁻¹ BA).

Túi phần tử các tổ hợp lai dùng trong thí nghiệm có khả năng phát triển mô sẹo trên môi trường khảo sát. Trong đó tổ hợp lai IR64/Jasmine85 tạo mô sẹo tốt trên môi trường N₆+ 2mg.l⁻¹ 2,4D+ 1mg.l⁻¹ NAA.

Các mô sẹo có khả năng tái sinh khác biệt trên các tổ hợp lai. Hai tổ hợp lai IR64/Jasmine85 và OM1490/Khao105 tái sinh cây xanh tốt trên môi trường MS+ 0.5mg.l⁻¹ NAA+ 2mg.l⁻¹ BA và MS+1mg. l⁻¹ Kinetin + 0,5mg.l⁻¹ NAA+ 2mg. l⁻¹ BA.

phân tích thống kê vùng anova và phân nhóm theo lsd với mức độ ý nghĩa p=0,05

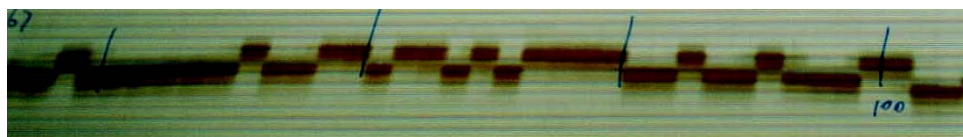
Các cây xanh nhân chồi hoàn chỉnh tốt trên môi trường MS + 2mg.L⁻¹BA và tạo rễ trên môi trường MS+0,5mg.L⁻¹NAA. Tuy nhiên cần tiếp tục nghiên cứu biến dị của cây trong quá trình khai thác tế bào haploid. Trồng và theo dõi khả năng kháng sâu bệnh cây cấy mô ngoài nhà lưới và ngoài đồng. Tuy nhiên sẽ đánh giá tiếp chất lượng của các dòng trên.

III.4.Đánh giá marker phân tử

3.4. Đánh giá PCR base trên hàm lượng amylose

Dùng microsatellite định vị trên gen hàm lượng amylose giúp đánh giá sự liên kết gen của quần thể con lai, dùng marker SSR, phân tích hàm lượng marker wxF với chiều dài của mã trình tự như sau : 5'ctttgtctatctcaagacac-3' wxR 5' ttgcagatgttctctctgatg -3' cho thấy đa hình trên quần thể amylose(Lang 2004). Đánh giá độ đa hình trên lúa mùa cho thấy có hai band với kích thước khác nhau. Độ đa hình phân biệt giữa hàm lượng amylose cao và thấp trên các quần thể lúa mùa (hình9)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



Hình 9 :Đánh giá đa hình bằng marker Wx phân tử trên các 15 giống lúa mùa và 9 giống cao sản.

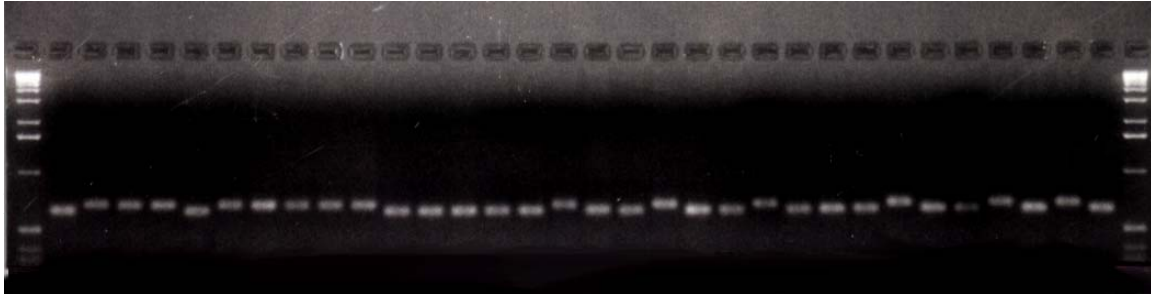
Đánh giá mùi thơm thông qua kiểu gen.

Từ kết quả phân tích trên tiếp tục phân tích để đánh giá kiểu gen thông qua marker phân tử : Đối với mùi thơm chỉ thị phân tử với marker SSR được thiết kế từ Lang và ctv 2004 dùng để đánh giá quần thể phân ly của BC1F2. Chỉ thị phân tử bằng SSR marker : Đối với chỉ thị phân tử này với RG28 F-R được ghi nhận trên hình 3. Marker RG 28F-R tách được các allele thơm và không thơm trên quần thể BC 1 F2.

Kết quả ghi nhận cho thấy với điều tra trên quần thể con lai độ đa hình giữa các cá thể giống nhau và khác nhau trên con lai so với bố mẹ rất khác biệt qua gen. Vị trí của DNA

trên quần thể chia ra các allele như sau : allele ở vị trí Ir 64 là 750 bp và vị trí DS 20 với allele vị trí 800 bp ghi nhận .

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31
32 M



Hình 10 : Kết quả phân tích marker phân tử với STS marker tách quần thể BC 1F2 trên cặp lai IR 64/ DS 20 . M: là marker chuẩn 1Kb . băng 1: là IR 64 , 2: DS20 . Từ 3 tới 32 là cá thể từ BC1F2

III.4. Đánh giá năng suất phẩm chất của các dòng có triển vọng

III.4.1 . thành công đưa ra so sánh và quan sát ngoài ruộng với 532 dòng, chọn so sánh sơ khởi là 25 dòng. Từ 25 chọn còn lại 5 dòng của từ 5 giống lúa (bảng 9) để so sánh khi đưa ra khảo nghiệm.

Kết quả phân tích ANOVA các dòng tế bào soma cho thấy phẩm chất của các giống đạt hàm lượng amylose trung bình, độ bạc bụng cấp 0. Ngoại trừ giống Nàng thơm Chợ đào.

Bảng 10. So sánh kết quả một số dòng từ nuôi cấy túi phấn vụ Hè thu năm 2003

Số dòng	Cây cao	Số chồi	Dài bông	Hạt lép/bông	Hạt chắc/bông	%lep	TL1000	NS(gram)
OM 1490	111.500	7.250	29.000	50.750	162.750	23.192	22.650	27.471
OM 3536	117.250	13.250	29.500	71.500	129.500	31.390	23.150	33.476
Jamine 85	113.500	11.750	29.500	79.000	172.250	31.495	22.950	38.911
Nàng thơm chợ đào	113.750	12.000	28.875	69.000	142.750	32.545	23.200	31.708
Khao Daw								
Mali 105	113.750	8.250	28.875	78.250	119.000	38.987	23.700	26.029
Trung bình	113.950	10.500	29.150	69.700	145.250	31.522	23.130	31.519
EMS	35.350	5.933	4.092	792.033	1984.750	92.158	3.618	44.670
cv %	5.218	23.199	6.939	40.377	30.672	30.455	8.224	21.205

F-value	0.486ns	4.551*	0.102ns	0.660ns	0.997ns	1.369ns	0.164ns	2.351ns
LSD 0.05	8.959	3.670	3.048	42.407	67.131	14.466	2.866	10.071
0.01	12.390	5.076	4.215	58.646	92.836	20.005	3.964	13.927

Bảng 11: Phân tích phẩm chất

Stt	Giống	Protein	Chiều dài hạt (mm)	Bạcbụng (cấp)	Độ bền gel	Amylose (%)	Độ trở hồ (Cấp)
1	OM 1490	8,58	7.31	0	43	24.1	3
2	OM 3536	8,9	7.71	0	44	24.2	3
3	Jamine 85	8,75	7,42	0	58	22.5	3
4	Nàng thơm chợ đào	8,23	7,10	0-7	50	23.5	7
5	Khao Daw Mali 105	8,64	7,23	0	48	23.1	3

III.2. đánh giá năng suất và phẩm chất các dòng nuôi cấy túi phấn

đánh giá năng suất và thành phần năng suất của các tổ hợp giàu vitamine A bốn tổ hợp cho thời gian ngắn từ 81-88 ngày đây là điều thú vị cho các giống luân canh ba vụ trong năm Đông xuân 2003 (bảng 11)

So sánh sơ khởi của các dòng giàu vitamine : Kết quả với 4 tổ hợp được chọn trên 145 dòng , và chọn ra 4 dòng từ 4 cặp lai để quan sát và đánh giá kết quả

Bảng 12: Các đặc tính hình thái của các dòng nuôi cấy túi phấn từ tổ hợp lai F1

Stt	Cặp lai	TGST (ngày)	Cao cây (cm)	Dài bông (cm)
1	OM 4392/ OM 1490	84	68.6	21.03 b
2	OM 4392/ OM 3536	81	74	20.96 b
3	OM 4392/ OM 2031	87	79.4	20.27 b
4	OM 4392/ Jasmin 85	88	80	23.28 a
				CV=5.23% $\alpha =0.01$

Tiếp tục nghiên cứu năng suất thì 4 giống được có năng suất từ 5 aans/ha. Tuy nhiên trọng lượng 1000 hạt rất thấp vì hạt rất nhỏ và ngắn.

Bảng 13: Các thành phần năng suất của các dòng nuôi cấy túi phấn từ tổ hợp lai F1

Stt	Nguồn gốc	Số bông/m ²	Số hạt chắc/bông	Tỉ lệ lép	TL1000 hạt	Năng suất (T/ ha)
1	OM 4392/ OM	381 a	70 b	15.66	20.58 a	4.97 b

	1490					
2	OM 4392/ OM 3536	368 a	73.46 b	44.62	20.38 a	5.94 a
3	OM 4392/ OM 2031	348 ab	70.24 b	18.28	20.67 a	5.233 b
4	OM 4392/ Jasmin 85	315 b	95.16 a	25.46	20.38 a	5.843 a
		CV=24.72 % $\alpha=0.1$	CV=18.40% $\alpha=0.05$		CV=2.45% $\alpha=0.01$	CV=15.85% $\alpha=0.1$

Phân tích phẩm chất của 4 dòng trên cho thấy hàm lượng amylose từ cặp lai OM 4392/OM 3536 cho hàm lượng amylose trung bình và độ bền gel trung bình

Bảng 14 Phân tích phẩm chất của bốn dòng trên được ghi nhận trên bảng

Stt	Protein	Vitamine A (%)	Chiều dài hạt (mm)	Bạc bụng (cấp)	độ bền gel	Amylose (%)	độ trở hồ (cấp)
OM 4392/ OM 1490	8,50	3.97	5.31	0	32	26.3	3
OM 4392/ OM 3536	8,12	2.05	5.71	0	50	22.3	6
OM 4392/ OM 2031	7,54	4.09	6.28	0	55	25.5	6
OM 4392/ Jasmin 85	8,23	2.15	5.81	1-5	37	24.1	6

Trên bảng 15 và 16 cho thấy khai thác tế bào soma một vài giống chợ có năng suất cao hơn bình thường như Nàng thơm chợ đào, OM 3536, nhưng ngược lại có nhiều giống lại thấp hơn bình thường như OM 1490. Phẩm chất mùi thơm nhiều giống lại mất đi như Nàng thơm chợ Đào, Khao DawMali 105.

Bảng 15: Năng suất và thành phần năng suất của các giống lúa từ túi phấn và tế bào soma Đông xuân 2003

Stt	Tón giòng	HC/ Bông	% hạt lép	TL 1000hạt	NS Tấn / ha
1	OM 1490(bình thường)	163	12.2	28.1	5.50**

2	OM 3536 (Soma)	148	13.7	28.3	5.40**
3	OM 1490/ KhawD 105	153	12.2	27.2	5.20**
4	Nàng thơm chợ đào (soma)	119	24.1	27.3	5.0**
5	JASMINE 85(Bình thường	128	29.7	27.5	4.50**
6	Jamine (tế bào soma)	104	32.7	25.4	4.50**
7	IR 64	135	17.7	27.2	4.40**
8	Khao DawMali 105(bình thường)	103	19.3	23.9	4.10*
9	IR 64/ Nàng thơm chợ đào	82	40.8	30.2	3.60 ^{ns}
10	Nàng thơm chợ đào (bình thường)	128	33.5	21.8	3.40
	CV%	7.73	19.43	1.58	10.30
	LSD 0.5	16.07	8.20	0.73	0.76
	0.1	21.77	11.11	0.98	1.03

Bảng 16: Phẩm chất gạo của các giống lúa từ soma và túi phôi

Stt	Tên giống	Dài hạt (mm)	Mùi thơm	Bạc bụng (cấp)	Độ bền gel	Amylose content %	Độ trở hồ (cấp)
1	OM 1490(bình thường)	7.02	0	0	51	24.1	3
2	OM 3536 (Soma)	7.80	1	0	54	24.7	5
3	OM 1490/ KhawD 105	7.53	0	0	60	21.4	5
4	Nàng thơm Chợ đào (soma)	6.87	0	0-1	43	26.7	5
5	JASMINE 85(Bình thường	7.22	1	0	40	23.4	3
6	Jamine (tế bào soma)	7.35	1	0	50	22.0	3
7	IR 64	7.25	0	0	41	24.1	3
8	Khao DawMali 105(bình thường)	7.11	2	0	50	21.7	6
9	IR 64/ Nàng thơm chợ đào	6.90	0	98	100	5.3	5
10	Nàng thơm chợ đào (bình thường)	6.22	1	90	100	6.6	5

Khảo nghiệm các dòng nuôi cấy tế bào soma và nuôi cấy túi phôi có hai dòng : Nàng thơm chợ đào -5 nuôi cấy biến dị soma năng suất cao tuy nhiên cứng cơm . Một dòng đột biến tế bào Soma từ Jasmine 85 .

Đánh giá năng suất hai dòng đưa đi khảo nghiệm

Giống đưa đi khảo nghiệm

Số tt	Tên giống	Nguồn gốc	Năng suất	Địa điểm khảo nghiệm
1	NTCD-5	Nàng thơm Chợ Đào	6-7tấn / ha	Trồng tại Viện lúa và Tỉnh Sóc

				Trắng
2	OM 5797	Nuôi cấy tui phần IR64/Jasmine 85	5 tấn	Đang trồng tại Viện

Hình 9 Giống năng thơm Chợ đào -5 trồng tại Sóc Trăng

Hình 10 : Hạt giống OM 5797

VI. kết quả và kiến nghị

Thời gian hình thành mô sẹo khác nhau từng loại giống

4392/ OM 3536 cho tẻ lâu cây tái sinh cao so với hầu hết các cặp lai .

Túi phân từ các tổ hợp lai dùng trong thí nghiệm có khả năng phát triển mô sẹo trên môi trường khảo sát. Trong đó tổ hợp lai IR64/Jasmine85 tạo mô sẹo tốt trên môi trường $N_6 + 2\text{mg.l}^{-1} 2,4\text{D} + 1\text{mg.l}^{-1} \text{NAA}$. Các mô sẹo có khả năng tái sinh khác biệt trên các tổ hợp lai. Hai tổ hợp lai IR64/Jasmine85 và OM1490/Khao105 tái sinh cây xanh tốt trên môi trường $\text{MS} + 0.5\text{mg.l}^{-1} \text{NAA} + 2\text{mg.l}^{-1} \text{BA}$ và $\text{MS} + 1\text{mg.l}^{-1} \text{Kinetin} + 0.5\text{mg.l}^{-1} \text{NAA} + 2\text{mg.l}^{-1} \text{BA}$. Các cây xanh nhân chồi hoàn chỉnh tốt trên môi trường $\text{MS} + 2\text{mg.l}^{-1} \text{BA}$ và tạo rễ trên môi trường $\text{MS} + 0.5\text{mg.l}^{-1} \text{NAA}$. Tuy nhiên cần tiếp tục nghiên cứu biến dị của cây trong quá trình khai thác tế bào haploid. Trồng và theo dõi khả năng kháng sâu bệnh cây cấy mô ngoài nhà lưới và ngoài đồng (hình 8)

Đánh giá các dòng nuôi cấy túi phân ngoài đồng và chọn hơn 25 dòng tiếp tục chọn được các dòng sau đây có triển vọng để đưa so sánh và quan sát làm bước tiền đề cho việc chọn giống sau này.

Môi trường cấy phải thay đổi phù hợp yếu tố di truyền theo từng lứa tuổi của túi phân để cho cây phát triển. Môi trường đầy đủ các thành phần vô cơ và dinh dưỡng theo yêu cầu sinh lý của cây. Thêm vào các nguyên nhân cơ bản như muối, và vitamine, hormone thúc đẩy việc tạo thành phôi và mô sẹo. Cytokinins (kinetin) là tối cần thiết để tạo mô từ hạt phân trên nhiều cây ngoại trừ thuốc lá. Auxin, 2,4-D gia tăng phôi trên các loài ngũ cốc. Đối với cây tái sinh, cytokinin và nồng độ auxin thấp là yêu cầu cần thiết. Một số nguyên nhân dẫn đến cây bạch tạng như sau :

- Tuỳ theo giống : tần số bạch tạng thay đổi tuỳ thuộc vào giống có giống ít có giống nhiều
- Nhiệt độ nuôi cấy : Nhiệt độ càng cao thì tỉ lệ cây bạch tạng càng cao
- Tuổi mô sẹo cấy chuyển sang môi trường cây tái sinh. Nếu dùng mô sẹo già cấy nhiều lần thường cho tỉ lệ tái

sinh thấp , mất khả năng tái sinh . Có tỉ lệ bạch tạng tăng

- Tăng lượng 2,4-D cũng là nguyên nhân gây cây bạch tạng.

Đánh giá năng suất của các giống trong vụ Hè Thu 2003 cho thấy các giống đều có năng suất cao nhưng lại phẩm chất không tốt . Còn các dòng có năng suất thấp lại phẩm chất tốt. Một số dòng có gạo thơm nhưng dài ngày và nhiễm sâu bệnh , cao cây , dễ đổ ngã. Để khắc phục trường hợp này chúng tôi tiếp tục cho lai tạo và lai ngược để tạo các dòng đạt cả ba yếu tố năng suất cao, phẩm chất tốt và kháng sâu bệnh , cứng cây.

Tóm lại hiện nay có 3 dòng được quan sát và đánh giá dòng OM 3405 được chọn dòng có năng suất cao ,thông qua nuôi cấy túi phấn. Một dòng do tạo từ nuôi cấy tế bào soma : OM 3566 có phẩm chất ngon cơm , có mùi thơm nhẹ .Nàng thơm chợ đào -5 được khai thác từ mô sẹo cho thấy năng suất cao , ngắn ngày và được đưa ra khảo nghiệm rộng tuy nhiên giống này mất mùi thơm

Tài liệu tham khảo

- Ahn SW, CN Bollich and SD Tanksley. 1992. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theor. Appl. Genet. 87:27-32
- Ayres NM, Mc Clung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD 1997. Microsatellite and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. Theor Appl Genet 94: 773-781
- Bao.J.S, H.corke.M.Sun 2002. Microsatellites in starch- synthesizing genes in relation to starch physiochemical properties in waxy rice (O.zativa sativa L.) Theor Apply genet .105:898-905.
- Berner DK, BJ Hoft. 1986. Inheritance of scent in America long grain rices. Crop Sci. 26:157-159
- Cao, H., ImparI-Radosevich, J.M., guan,H., Keeling, P.L., James, M.G, and Myers, A.M.1999. Identification of soluble starch synthase activity of maize endosperm.Plant Physiol.120: 205-215.
- Chakravarty AK. 1948. A genetic study of the botanical characters in rice. Bull. Bot. Bengal 2:50-57
- Chang TT, Li CC(1991) Genetics and breeding . In : luh BS . Rice production . Van Nostrand Reinhold , New York pp32-101
- Dhulappanavar CV, SW Mensikai. 1969. Inheritance of scent in rice. Karnakata Univ. J. 14:125-129
- Dhulappanavar CV. 1976. Inheritance of scent in rice. Euphytica 25:659-662

Dong JY, E Tsuzuki, and H Terao. 2000. Inheritance of aroma in four rice cultivars (*Oryza sativa* L.) IRRI International Rice Research Notes 25.2.2000

Ghose RLM, WT Butany. 1952. Studies on the inheritance of some characters in rice. Indian J. Genet. Plant Breed. 12:26-30

Govindewami và Ghose 1969: the time of harvest , moisture content and method of drying on milling quality of rice . *Oryza* 6: 54-66

He P, LiSG, Qian Q, Ma Y Q, li J Z , wang WM, Chen Y, Zhu L H 1999. Genetic analysis of rice grain quality. *Theor Appl Genet* 98: 502-508

IRRI. 1996: Standard Evlution System . international rice research Institute , Los banos, philippine

Kadam BS, VK Patankar. 1938. Inheritance of aroma in rice. *Chron. Bot.* IV. 6:496-497

Kuipers, A.G.j., jacobsen, E. and Visser, r.G.f.1994. Formation and deposition of amylose in the potato tuber starch granule are affected by the reduction of granule- bound starch synthase gene expression . *Plant Cell* 6: 43-52.

Lander ES, D Botstein. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. Genetics 121:185-199.

Nguyễn Thị lang, 2002 . Nghiên cứu cơ bản trong công nghệ sinh học. Nhà xuất bản nông nghiệp

Nagaraju M, D Chaudhary, MJB Rao. 1975. A simple technique to identify scent in rice and inheritance pattern of scent. *Curr. Sci.* 44: 599

Pooni hs , Kumar, Khush GS .1992. A comprehensive model for disomically inherited metrical traits expressed in triploid tissues . *Heredity* 69: 166-174

Reddy RP, K Sathyanarayanaiah. 1980. Inheritance of aroma in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 40:327-329

Richharia RH, B Minsro, VA Kulkani. 1965. Studies in the world genetic stock of rice. IV. Distribution of scent rice. *ORYZA* 2:57-59.

Sadavisam và Manikam 1992. Biochemical method for argicultural sciences Wiley Eastern, New Delhi ,India

Shi.C.H.,J.Zhu, R.C.Zhang , G.L Chen 1997 , Genetic and heterosis analysis for cooking quality traits of indica rice in different environments. *Theor Appl Genet* 95:294-300.

Seung Yeob Lee , Joong Ho Lee , tae Oh Kwon 2003. selection of salt tolerance doubled haploids in rice anther culture . *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 74:143-149.

Sibi, M.1976 La moyion de program genetique chez les vegetaus superieurs.II Aspect experimental obtention do variants par culture de

Sood BG, EA Siddiq. 1978. A rapid technique for scent determination in rice. *Indian J. Genet. Plant Breed.* 38:268-271

Tang SX, GS. Khush , BO Mohanty .1991 Genetic of gel consistency in rice . *Indian J. Genet.* 70(2) : 69-78

Tripathi RS, MJBK Rao. 1979. Inheritance and linkage relationship of scent in rice. *Euphytica* 28:319-323

Tsuzuki E, E Shimokawa. 1990. Inheritance of aroma in rice. *Euphytica* 46:157-159

- Yamamori .M .S.fujita; K. Hayakawa. J. Matsuki . T.Yasui 2000. Genetic elimination of a starch granule protein , SGP-1 of wheat generates an altered starch with apparent high amylose. *Theo Appl Genet* ,101:21-29.
- Yanagisawa.T,C.Kiribuch-Otobe, H. Hirano , Y.Suzuki , M.Fujita 2003. Detection of single nucleotide polymorphism (SNP) controlling the waxy character in wheat by using a derived cleaved amplified polymorphic sequence (dCAPS) marker. *Theo appl genet* 107:84-88